

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Laurat und Melittin:
Effekte im intestinalen Epithelzellmodel
HT-29/B6

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Isabel Dittmann

aus Bremen

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Abstract: Laurate and melittin effects in the intestinal epithelial cell model HT-29/B6.....	3
Abstract: Laurat und Melittin: Effekte im intestinalen Epithelzellmodell HT-29/B6	5
1 Einleitung	7
1.1 Pharmakotherapie	7
1.2 Transzelluläre und parazelluläre Resorption.....	8
1.3 Absorptionsenhancer	9
1.3.1 Laurat.....	10
1.3.2 Melittin	11
1.4 Epithelien: Vorkommen, Funktion und Struktur.....	12
1.4.1 Permeabilität von Epithelien	13
1.4.2 Transepithelialer Widerstand	14
1.4.3 Barrierestörungen	14
1.5 Tight Junctions: Regulatoren der parazellulären Passage.....	15
1.5.1 Funktion und Struktur der Tight Junctions (TJ).....	16
1.5.2 Bizelluläre und trizelluläre Tight Junctions (bTJ und tTJ)	17
1.5.3 Tight Junction-Proteine	18
1.5.3.1 Occludin	18
1.5.3.2 Claudine	19
1.5.3.3 Tricellulin	21
1.5.3.4 Junctional Adhesion Molecule (JAM) und CAR	21
1.5.3.5 MarvelD3.....	22
1.5.4 Tight Junction-assoziierte Proteine.....	22
2 Zielsetzung.....	24
3 Materialien und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Geräte	25
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
3.1.3 Chemikalien	26
3.1.4 Zelllinie HT-29/B6	28
3.1.5 Puffer und Lösungen	29
3.2 Methoden	32
3.2.1 LDH-Assay zur Viabilitätsprüfung	32
3.2.3 Elektrophysiologie.....	33
3.2.3.1 Manuelle Widerstandsmessung mittels Chopstickelektroden	33
3.2.3.2 Kurzschlussstrom-Methode nach Ussing.....	34
3.2.3.3 Fluxmessungen parazellulärer Größenmarker.....	36
3.2.3.5 Impedanzspektroskopie	38
3.2.4 Molekularbiologie	40
3.2.4.1 Western Blot.....	40
3.2.4.2 Proteinextraktion aus epithelialen Monolayern	40
3.2.4.3 Membran-Protein-Extraktion aus epithelialen Monolayern	40
3.2.4.4 Proteinquantifizierung (Pierce, BCA)	41
3.2.4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	41
3.2.4.6 Elektrotransfer	42
3.2.4.7 Immundetektion mit POD-konjugiertem Zweitantikörper.....	43
3.2.4.8 Immunfluoreszenz.....	43
3.2.5 Auswertung und Statistik	45

4 Ergebnisse	46
4.1 Effekte von Laurat	46
4.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung	46
4.1.2 Zeit-Reversibilitäts-Beziehung	47
4.1.3 Zellviabilitätsmessung mittels LDH-Assay	48
4.1.4 Zwei-Wege-Impedanzmessung	49
4.1.5 Markerflux-Experimente	50
4.1.5.1 Permeabilitäten von Fluorescein und FITC-Dextran	50
4.1.5.2 Permeabilität von Sulpho-NHS-SS-Biotin	51
4.1.6 Western Blots	52
4.1.7 Immunfluoreszenz	53
4.1.8 Inhibitorexperimente	56
4.2 Effekte von Melittin	58
4.2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung	58
4.2.2 Zeit-Reversibilitäts-Beziehung	59
4.2.3 Zellviabilitätsmessung mittels LDH-Assay	60
4.2.4 Zwei-Wege-Impedanzmessung	61
4.2.5 Markerflux-Experimente	61
4.2.6 Western Blots	62
4.2.7 Immunfluoreszenz	64
4.2.8 Inhibitorexperimente	65
5 Diskussion	67
5.1 Analyse von Laurat- und Melittineffekten in HT-29/B6-Epithelzellen	67
5.2 Laurateffekte	67
5.2.1 Zellviabilität und elektrophysiologische Effekte von Laurat	67
5.2.2 Spezifische Effekte von Laurat auf die parazelluläre Barriere	69
5.3 Melittineffekte	70
5.3.1 Zellviabilität und elektrophysiologische Effekte von Melittin	70
5.3.2 Spezifische Effekte von Melittin auf die parazelluläre Barriere	71
5.4 Beurteilung der Ergebnisse	72
6 Zusammenfassung	75
Literaturverzeichnis	77
Internetquellen	85
Abkürzungsverzeichnis	86
Lebenslauf	89
Verzeichnis der eigenen Publikationen	91
Danksagung	92
Eidesstattliche Versicherung	93

Abstract: Laurate and melittin effects in the intestinal epithelial cell model HT-29/B6

Drug absorption across the gastrointestinal epithelium can occur physiologically via transcellular and paracellular pathways, but may be limited by specific molecular traits. Hydrophilic drugs pose a special challenge in drug development as they cannot pass the lipid bilayer of the cell's membrane without specific uptake mechanisms and depend on a paracellular passage through the intercellular space. This passage is characterized by a passive permeability that can be specifically modified through the barrier-forming proteins of the tight junction.

In the context of optimizing systemic and organ-selective drug application methods, absorption enhancement attempts the selective and reversible regulation of the epithelial intestinal barrier, thereby facilitating the temporary passage of macromolecules. Laurate, a medium-chain fatty acid, occurring in foods such as coconut oil, cow's and human milk, as well as the xenobiotic peptide melittin, occurring in bee's poison, have both come into focus as novel absorption enhancers improving transepithelial drug uptake. The mechanisms by which they affect the epithelial barrier, however, are not yet fully understood.

The aim of this study was to analyze the effects of laurate and melittin on paracellular permeability and tight junction proteins in confluent monolayers of the intestinal epithelial cell line HT-29/B6. Exposure with 3.5 mM laurate resulted in a reversible decrease in transepithelial resistance down to 50 % of initial values, identified to be the result of an exclusive drop in paracellular resistance by two-path impedance spectroscopy. Laurate exposure induced an increase in the permeability for fluorescein (330 Da), whereas permeability for biotin (600 Da) or FITC-dextran (4 kDa) did not increase. Confocal laser-scanning microscopy revealed a decrease of claudin-5 within tight junction complexes for laurate, without effects on other barrier-forming tight junction proteins including tricellulin, a barrier former preventing the paracellular passage of macromolecules. While 0.3 μ M melittin induced a drop in TER down to 60 % of initial values, permeability did not markedly increase. In accordance with the flux experiments, protein expression and distribution in melittin-exposed cells remained unchanged.

In conclusion, Melittin does not induce any significant increase in permeability and is therefore not considered a candidate for absorption enhancement in HT-29/B6 cells. Laurate, however, induced increased paracellular permeability for smaller molecules

without affecting either tricellular cell contacts or the paracellular passage of macromolecules. Laurate's suitability as an enhancer of a size-selective drug uptake for smaller molecules suggests minimal adverse effects of an unwanted passage of larger compounds such as toxins and immunomodulatory agents.

Abstract: Laurat und Melittin: Effekte im intestinalen Epithelzellmodell HT-29/B6

Die Absorption von Medikamenten über das gastrointestinale Epithel kann sowohl trans- als auch parazellulär erfolgen, wird jedoch von spezifischen Subanzeigenschaften der eingesetzten Stoffe limitiert. In der Medikamentenentwicklung stellen dabei insbesondere hydrophile Substanzen eine Herausforderung dar, da sie anders als lipophile Moleküle nicht ohne spezifische Transportsysteme über die Zellmembran diffundieren können und sich somit eher für eine parazelluläre Passage durch den Interzellularspalt eignen. Diese Passage ist durch eine passive Permeabilität charakterisiert, die spezifisch über die barriereformenden Proteine der Tight Junction beeinflusst werden kann.

In der Entwicklung von Absorptionenhancern wird diesbezüglich die selektive, reversible Regulation der epithelialen Barriere angestrebt, die eine temporäre Passage von Makromolekülen und somit die gezielte Absorption eines Medikaments ermöglichen soll. Die mittelkettige Fettsäure Laurat, die u.a. natürlicherweise in Kuh-, Muttermilch und Palmfett vorkommt, sowie das xenobiotische Peptid Melittin aus dem Gift der Honigbiene werden derzeit als Absorptionenhancer einer transepithelialen Medikamentenaufnahme diskutiert. Die genauen Wirkmechanismen sind bisher jedoch weder für Laurat noch Melittin vollständig verstanden.

Das Ziel dieser Studie war die Analyse der Effekte von Laurat und Melittin auf die parazelluläre Permeabilität und die Proteine der Tight Junction in konfluenten Monolayern der intestinalen Epithelzelllinie HT-29/B6. Die Exposition mit 3,5 mM Laurat resultierte dabei in einem Absinken des transepithelialen Widerstands auf 50 % der Initialwerte. Dieser Effekt konnte im Rahmen einer Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie vorrangig als Veränderung im parazellulären Anteil des transepithelialen Widerstands identifiziert werden. Die Lauratexposition führte zudem zu einer Zunahme der Permeabilität für Fluorescein (330 Da), während die Permeabilitäten für Biotin (600 Da) und FITC-Dextran (4 kDa) unter Lauratzugabe unverändert blieben. Immunhistochemisch zeigte sich für Laurat eine Abnahme von Claudin-5 in Tight-Junction-Komplexen, jedoch ohne Effekt auf weitere TJ-Proteine wie das Tricellulin, das als Barriereformer die parazelluläre Passage von Makromolekülen verhindert.

Während die Zugabe von 0,3 μ M Melittin ebenfalls einen Abfall des transepithelialen Widerstands auf 60 % der Initialwerte bewirkte, kam es zu keinem Anstieg der Permeabilität. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fluxexperimente zeigte sich auch

keine veränderte Proteinexpression bzw. -distribution unter Melittinzugabe. Melittin führte also zu keiner signifikanten Veränderung der Permeabilität und erwies sich somit nicht als geeigneter Kandidat für eine Verstärkung der Absorption in HT-29/B6-Zellen. Es zeigte sich jedoch, dass Laurat eine verbesserte Permeabilität für kleinere Moleküle bewirkt, ohne dabei die trizelluläre Barriere oder die Passage von Makromolekülen zu beeinflussen. Somit eignet sich Laurat als Absorptionenhancer für eine größen-selektive Medikamentenabsorption unter Erhalt der intakten Barrierefunktion des Epithels gegen größere Moleküle wie z.B. toxische und immunomodulatorische Noxen.

1 Einleitung

1.1 Pharmakotherapie

Der Erfolg einer Pharmakotherapie wird maßgeblich durch die Kooperationsbereitschaft des Patienten zur Medikamenteneinnahme bestimmt. So ist es nicht verwunderlich, dass mangelnde Patientencompliance bezüglich Zeitpunkt, Dosierung und Regelmäßigkeit der Medikamenteneinnahme zu den Hauptgründen für das Versagen einer medikamentösen Therapie zählt (Osterberg & Blaschke, 2005). Ein umsichtiger Einsatz von Medikamenten durch den Kliniker sowie eine erleichterte Applikation durch den Patienten können somit viel zum korrekten Einhalten einer Pharmakotherapie beitragen (Shahiwala et al., 2011). Die Pharmakodynamik und -kinetik des eingesetzten Pharmakons sowie dessen jeweilige Zielstruktur bleiben jedoch für Erfolg und Wirksamkeit entscheidend (vgl. Herdegen, 2010). Während parenteral verabreichte Medikamente aufgrund einer schnellen Bioverfügbarkeit und hohen Effizienz im stationären Bereich sinnvoll eingesetzt werden können, eignen sie sich nicht für eine ambulante, oft längerfristige Pharmakotherapie (Maher et al., 2007). Hier ist die orale Medikamenteneinnahme Applikationsweg der Wahl.

Diese ist zwar mit einer höheren Patientenakzeptanz und somit auch besseren Compliance belegt als beispielsweise eine intravenöse Medikamentengabe, jedoch mit anderweitigen Problemen behaftet (Blackwell, 1973; Kucukarslan, 2012). Eines der Hauptprobleme liegt dabei in der oralen Bioverfügbarkeit der eingesetzten Pharmaka. Gerade peptidbasierte Medikamente, aber auch Peptidomimetika besitzen eine niedrige orale Bioverfügbarkeit (Aungst et al., 1996), die häufig mit schwankenden und schlecht prognostizierbaren Plasmakonzentrationen korreliert. Eine Kontrolle der Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge und der potentiell toxischen Effekte ist somit erschwert (Aungst et al., 1996). Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW), die daraus resultieren, können wiederum die Kooperationsbereitschaft und das korrekte Einnahmeverhalten des Patienten vermindern (Kucukarslan, 2012). Dies hat das Verordnen höherer Konzentrationen bei vermeintlicher Unwirksamkeit zur Folge – ein Teufelskreis entsteht, aus dem schwer auszubrechen ist.

Gleichzeitig kommt es durch die Ausscheidung (und somit Verschwendung) nicht-resorbierter Medikamentendosen – abgesehen von einer individuellen Belastung des Patienten – zu zusätzlichen, durchaus relevanten Kosten für das Gesundheitssystem (Aungst et al., 1996).

Da sich die Patientencompliance nur zu einem geringen Grad kontrollieren lässt und von einigen schwer beeinflussbaren externen Faktoren abhängig ist (Kucukarslan, 2012), könnte der Schlüssel also in der Verbesserung der Resorptionseigenschaften des applizierten Pharmakons liegen.

1.2 Transzelluläre und parazelluläre Resorption

Resorption ist sowohl auf transzellulärem als auch auf parazellulärem Wege möglich.¹ Auf dem transzellulären Weg kann die Passage sowohl direkt durch Diffusion über die Zellmembran erfolgen, als auch rezeptor-, poren- oder kanalvermittelt. Der transzelluläre Transport ist dabei energie- und gradientenabhängig (vektorieller Transport), sowie von spezifischen Substanzeigenschaften beeinflusst. Lipophile Substanzen verfügen aufgrund einer erleichterten Membrangängigkeit durch den Lipid-Bilayer der Zellmembran über eine deutlich bessere Passagefähigkeit als peptid- oder proteinbasierte, hydrophile Pharmaka, die eine substratspezifische Uptake-Mediation durch Transporter und Rezeptoren erfordern. Bislang sind jedoch nur wenige Transporter bekannt, die eine spezifische Absorption ermöglichen, wie der intestinale Oligopeptidtransporter PepT1, der Peptidomimetika (z.B. das β -Laktam-Antibiotikum Ampicillin und 5-Aminolaevulinsäure) als Substrat akzeptiert (Amasheh et al., 1997; Döring et al., 1998a, 1998b). Die strukturelle Anpassung einer Substanz an ein vorhandenes Transportsystem, die bei erhaltener pharmakologischer Aktivität eine verbesserte intestinale Barrieregängigkeit ermöglicht, lässt sich jedoch nur in Einzelfällen realisieren (Aungst et al., 1996). Für die meisten Substanzen, die nicht von Rezeptoren als Substrat erkannt bzw. ohne Wirksamkeitseinbuße modifiziert werden können, erweist sich dieser Ansatz des Absorptionenhancements als ungeeignet.

Eine vielversprechende Alternative für die Absorption hydrophiler Makromoleküle bietet stattdessen die parazelluläre Passage durch den Interzellularspalt und über die Tight Junctions. Dieser Weg zeichnet sich durch eine passive Permeabilität aus, die sich durch eine Modifizierung der Barriereproteine relativ spezifisch beeinflussen lässt (Rosenthal et al., 2012b).

¹ Rosenthal et al. (2012a) verweisen noch auf einen weiteren Weg der epithelialen Passage über Bereiche apoptotischer Zellen. Da hierfür jedoch einzelne Zellen des Zellverbands geschädigt werden bzw. zugrunde gehen, wird diese Passagemöglichkeit hier nicht weiter berücksichtigt.

1.3 Absorptionsenhancer

Im Kontext der Weiterentwicklung und Optimierung einer systemischen und organoselektiven Medikamentenapplikation, dem sogenannten *Drug Targeting* bzw. der *Targeted Drug Delivery*, sind verschiedene pharmakologische Substanzen auf eine Eignung als Absorptionsenhancer (AE) hin untersucht worden. Der Ansatz eines Absorptionsenhancements besteht dabei meist in der selektiven und reversiblen Regulation der epithelialen Barriere, die die temporäre Passage von Makromolekülen ermöglicht (Rosenthal et al., 2012a). Einige grundlegende Kriterien sollten deswegen bei der Entwicklung eines Absorptionsenhancers erfüllt sein. Die Reproduzierbarkeit der verbesserten intestinalen Permeabilität und eine garantierte Zellviabilität sind hierfür ebenso erforderlich wie ein Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen (vgl. Aungst et al., 1996). Auch lokale Kurzzeit- und Langzeitwirkungen des AEs müssen beachtet werden. Bei einer oral-gastrointestinalen Applikation ist beispielsweise ein rasch einsetzender Effekt von Vorteil, da das intestinale Epithel aufgrund der propulsiven Peristaltik des Darmes lokal jeweils nur für kurze Zeit einer ausreichenden Konzentration von AE und Medikament ausgesetzt ist. Bei rektaler Applikation kommt es hingegen zu lokal länger andauernder Einwirkung der Substanzen, so dass hier die Langzeitwirkung ebenso wie eine eventuelle Schädigung des Epithels berücksichtigt werden muss (Lindmark et al., 1998).

Die Erforschung absorptionsverbessernder Substanzen mit Wirkung auf die epitheliale Permeabilität ist seit den 1960er Jahren etabliert: In Ratten- und Hundemodellen konnte gezeigt werden, dass sich mit dem Ca^{2+} -Chelator Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA) die Absorption von Heparin und synthetischen Heparinoiden verbessern lässt (Windsor & Cronheim, 1961).

Auch verschiedene mittelkettige Fettsäuren (MCFA) wurden bzgl. ihrer permeabilitätsverbessernden Eigenschaften für hydrophile Makromoleküle diskutiert und untersucht (Lindmark et al., 1995; Lindmark et al., 1998; Krug et al., 2013). Bisher ist jedoch Caprat (C10), die aliphatische, gesättigte Decansäure (Trivialname Caprinsäure), die einzige Substanz, die klinisch als absorptionsverbessernde Komponente eines rektalen Ampicilinsuppositoriums eingesetzt wird (Lindmark et al., 1997). Weitere MCFAs, aber auch andere Moleküle wie das xenobiotische Peptid Melittin oder das Polysaccharid Chitosan bieten sich für eine Nutzung als Absorptionsenhancer an (Maher et al., 2007; Rosenthal et al., 2012b).

Die Öffnung der parazellulären Barriere für größere Medikamentenmoleküle birgt jedoch potentiell das Risiko, dass immunoreaktive Substanzen und Noxen ebenfalls das Epithel passieren. Deswegen sollte in der Entwicklung von AEs nicht nur die Reversibilität des Effekts, sondern auch die Größenselektivität der Permeabilisierung berücksichtigt werden.

1.3.1 Laurat

Laurat (C12), die Dodecansäure (Trivialname Laurinsäure), ist wie Caprat eine aliphatische, gesättigte mittelkettige Fettsäure. Die Molmasse von Laurat beträgt 200,32 g/mol (Natriumlaurat: 222,3 g/mol). Bei 101,3 kPa und 20 °C liegt Laurat in Form fester, weißlicher Kristalle vor. Die Löslichkeit in Wasser ist mit 0,058 g/l H₂O gering.² Laurat besitzt ein Gerüst aus 12 Kohlenstoffatomen und kommt als Glycerinester in verschiedenen Triglyceriden wie z.B. Kokosfett, Palmkernfett und Lorbeeröl, aber auch in tierischen Fetten vor (vgl. Mortimer & Müller, 2010).

Die Anwendung von Laurat als Lebensmittelzusatz, beispielsweise in Rapsölen, ist von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen bzw. reguliert.³ Ein hoher Anteil am Fettgehalt humaner Milch – bis zu 6,4 % des totalen Fettgehalts (Francois et al., 1998; Moltó-Puigmartí et al., 2011) – prädestiniert Laurat als potentiell verträglichen Absorptionenhancer.

Über die Wirkmechanismen von Laurat auf die epitheliale Barriere ist bislang wenig bekannt. Bisher konnte für Laurat ein rasches Absinken des transepithelialen Widerstandes in Caco-2-Zellklonen (Lindmark et al., 1995; Lindmark et al., 1998) und eine erhöhte Durchlässigkeit für Makrosolute wie Fluorescein und [¹⁴C]-Mannitol gezeigt werden (Lindmark et al., 1998). Der Anstieg der Permeabilität für Markermoleküle wurde hierbei auch als deutlich schneller beschrieben als bei anderen Tight Junction-selektiven AEs wie Palmitoylcarnitin (Hochman et al., 1994) oder Chitosan (Schipper et al., 1996). Der Einsatz verschiedener Inhibitoren in Kombination mit Laurat deutete dabei auf einen Phospholipase-C-(PLC)-vermittelten Signalweg hin (Lindmark et al., 1998). Zusätzlich wurde zwischen einem Kurzzeit- und einem Langzeiteffekt von Laurat unterschieden. Während der Langzeiteffekt durch Inhibitoren wie den Ca²⁺/Calmodulin-Antagonisten

² Alle Informationen zu den Stoffeigenschaften der Laurinsäure sind der GESTIS-Stoffdatenbank des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung entnommen:

[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/027100.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/027100.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0), 27.10.2012, 12:45h.

³ <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/FoodAdditiveListings/ucm091048.htm#ftnL>, 24.10.2012, 10:00h.

W7 und den MLCK-Inhibitor ML7 partiell aufgehoben werden konnte, ließ sich der Kurzzeiteffekt kaum beeinflussen (Lindmark et al., 1998). Zwar blieb unter Einwirkung des Inhibitors der TER stabil, die Permeabilität durch Laurat erhöhte sich jedoch trotzdem (Lindmark et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass der Kurzzeiteffekt zusätzlich noch über einen weiteren, PLC-unabhängigen Signalweg vermittelt wird. Es wurde dabei nicht ausgeschlossen, dass in verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit vom Expressionshintergrund unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden (Lindmark et al., 1998).

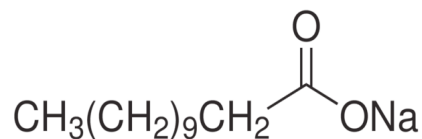


Abb. 1: Strukturformel von Natriumlaurat.⁴

1.3.2 Melittin

Das Peptid Melittin macht einen hohen Anteil (~50 %) des Giftes der europäischen Honigbiene *Apis mellifera* aus (Meier, 1995). Sein Molekulargewicht beträgt 2846,46 g/mol. Seine amphiphile, α -helikale Struktur setzt sich aus insgesamt 26 Aminosäuren (NH₂-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-CONH₂) zusammen, von denen die apolaren, hydrophoben und neutralen Aminosäuren den N-Terminus, die polaren, hydrophilen und basischen Aminosäuren den C-Terminus konstituieren (Meier, 1995). Als natürliches Detergenz ermöglicht die amphipathische Struktur eine Insertion in die Zellmembran, wo es über tetramere Porenbildung eine Lyse der Zellen bewirken kann (Pratt et al., 2005). So wurde Melittin bereits als Membrane-Attack-Protein ähnlich dem Granulysin oder Peptiden des Komplementsystems beschrieben (Pratt et al., 2005).

In Dosierungen zwischen 0,5 μM und 2,0 μM kommt es jedoch zu keiner vollständigen Disruption der Zellmembran (Pratt et al., 2005). Der lytische Einfluss des Melittins auf die Zellmembran scheint somit bei niedrigeren Konzentrationen keine vordergründige Rolle zu spielen. Bei Konzentrationen unter 0,5 μM wird also von einem primären Effekt auf die epithelialen Barriereproteine der Tight Junction ausgegangen.

Im Caco-2-Zellmodell wurde der Effekt des Melittins sowohl mit einem Absinken des transepithelialen Widerstands als auch mit einer verbesserten Permeabilität verschie-

⁴ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/L9755?lang=de®ion=DE>, 19.11.2012, 11:00h.

dener FITC-Dextrane (4-70 kDa) beschrieben (Maher et al., 2007). Inhibitoren der Phospholipase A2 (Aristolochiasäure, Indomethacin), aber auch der Cyclooxygenaseinhibitor Piroxicam konnten diese Effekte partiell attenuieren (Maher et al., 2007). Dies könnte auf einen Prostaglandin-vermittelten Signalweg in der Regulation der Tight Junctions durch Melittin hinweisen.

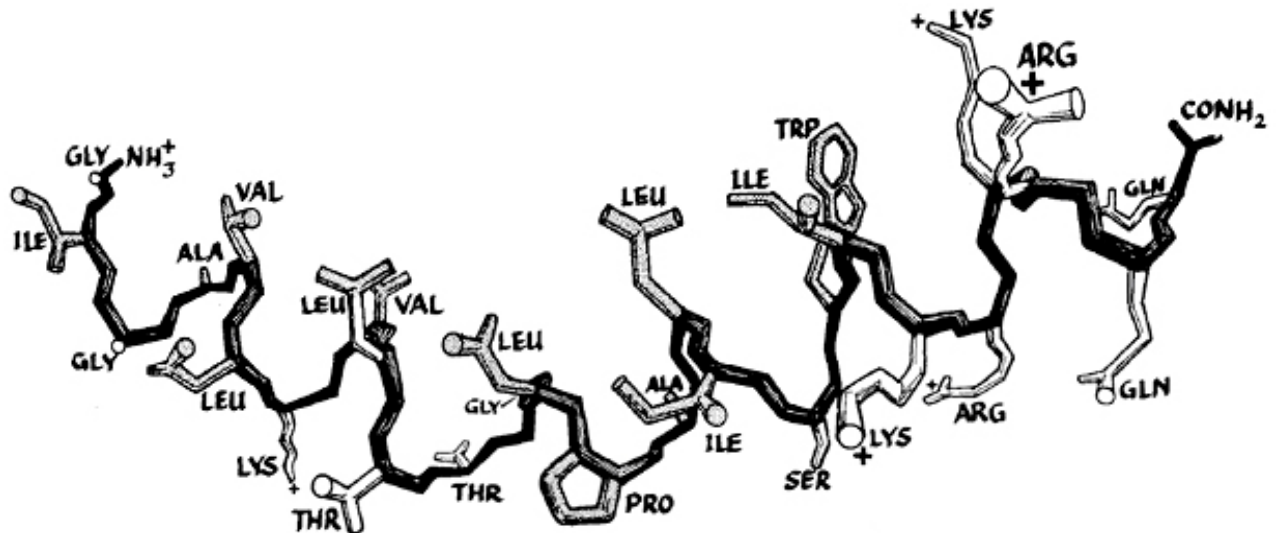


Abb. 2: Melittin. Peptid aus dem Bienengift bestehend aus 26 Aminosäuren, geladene Reste mit + markiert (Terwilliger & Eisenberg, 1982).

1.4 Epithelien: Vorkommen, Funktion und Struktur

Epithelien sind hochspezialisierte Zellverbände, die die Grenzflächen des Körpers bedecken. Dies können äußere Grenzflächen des Organismus zur Umwelt und Abgrenzungen innerer Kompartimente sein. Epithelien tragen mit spezifischen Eigenschaften zur Homöostase und Aufrechterhaltung des inneren Milieus bei, indem sie Transport-, Resorptions-, Sekretions- und Filtrationsvorgänge ermöglichen und als Barriere den Organismus, bzw. die subepithelialen Strukturen vor endogenen und exogenen Noxen schützen (vgl. Fromm, 2010).

Funktion und Aufbau der Epithelien sind dabei von der Lokalisation abhängig. So unterscheiden sich Epidermis (als äußerste Grenzschicht der Haut), Endothel (als Auskleidung der Blut- und Lymphgefäße), die Epithelien des Respirations-, Urogenital- und Verdauungstraktes, sowie Sinnes- und Drüsenepithelien zwar im spezifischen Aufbau, allen gemein ist jedoch die polare Struktur und die Verankerung an der Basalmembran. Ein apikaler, zur freien Oberfläche hin orientierter und ein basolateraler Zellpol können voneinander abgegrenzt werden (vgl. Lüllmann-Rauch, 2010).

Verschiedene Strukturen verbinden die Zellen als funktionelle Einheit. Haftverbindungen (Zonulae adhaerentes, auch Desmosomen oder Adherens Junctions), kommunizierende Verbindungen (Konnexone, auch Nexus oder Gap Junctions) und abdichtende Verbindungen (Zonulae occludentes, auch Tight Junctions) schaffen die Voraussetzung für die Koordination und Kooperation im Zellverband. Haftverbindungen dienen der mechanischen Verankerung, während Gap Junctions über Kanäle bzw. Poren die interzelluläre Kommunikation und den Stoffaustausch innerhalb des Zellverbandes ermöglichen (z.B. Elektrolyte, ATP, Glukose und Aminosäuren bis zu einem Molekulargewicht von 1000 Da). Weder Desmosomen noch Konnexone sind epithelienspezifisch und kommen auch in nicht-epithelialen Geweben vor, beispielsweise in Myokardzellen. Tight Junctions dienen der Barrierefunktion und sind spezifisch für epitheliale Gewebe. Sie regulieren den parazellulären Anteil der absoluten epithelialen Permeabilität.

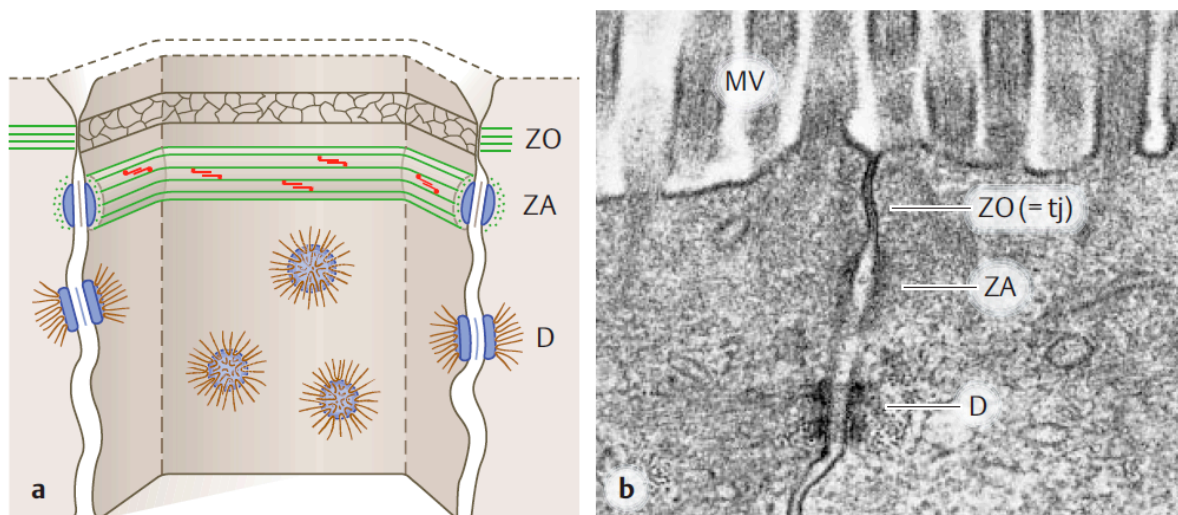


Abb. 3: Junktionaler Komplex. a: Schema einer Epithelzelle mit Zell-Zell-Kontakt bestehend aus Zonula occludens (ZO), Zonula adherens (ZA) und Desmosom (D) (Lüllmann-Rauch, 2010, S.35); b: elektronenmikroskopische Darstellung epithelialer Zellen mit Mikrovillibesatz (MV) (Tsukita & Furuse, 2000b).

1.4.1 Permeabilität von Epithelien

Der Quotient aus parazellulärer und transzellulärer Permeabilität gibt Auskunft über die Permeabilitätseigenschaften bzw. die „Leckheit“ eines Epithels. *Leck* Epithelien transportieren charakteristischerweise große Stoffmengen, können jedoch keine wesentlichen transepithelialen Konzentrationsgradienten aufbauen. Zu ihnen gehören alle proximalen Segmente röhrenförmiger Epithelien (proximaler Nierentubulus, Dünndarm etc.), deren absolute Permeabilität dank einer ausgeprägten parazellulären Durchlässigkeit entsprechend hoch ist.

Dichte Epithelien, die zwar nur einen geringen Nettostofftransport aufweisen, sind dafür in der Lage, aufgrund einer geringen parazellulären Permeabilität hohe Konzentrationsgradienten aufzubauen. Hier erfolgt der Stofftransport zum größten Teil transzellulär über spezifische Transportproteine der apikalen Zellmembran. Zu ihnen zählen alle distalen Segmente röhrenförmiger Epithelien (distaler Nierentubulus und Sammelrohr, Dickdarm etc.).

Undurchlässige Epithelien wiederum haben primär eine Barrierefunktion (Epidermis, Harnblase); ein transepithelialer Stoffaustausch soll physiologischerweise vermieden werden (vgl. Fromm, 2010).

1.4.2 Transepithelialer Widerstand

Die obengenannten Eigenschaften spiegeln sich auch im transepithelialen Widerstand wider, der bei lecken Epithelien typischerweise deutlich niedriger ist als bei dichten oder undurchlässigen Epithelien. So verfügt Ileumepithel (Kaninchen) mit $115 \Omega \cdot \text{cm}^2$ als leckes Epithel über einen deutlich geringeren transepithelialen Widerstand als das dichtere Epithel des distalen Kolon (Kaninchen) mit $730 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Powell, 1981). Ursache für diesen Unterschied des TER sind die „dichteren“ Tight Junctions des Kolonepithels, die den hohen elektrochemischen Gradienten, der durch aktiven transzellulären Transport aufgebaut wird, aufrechterhalten können (Anderson & Van Itallie, 2009).

1.4.3 Barrierestörungen

Verschiedene Erkrankungen gehen mit einer Störung der epithelialen Barrierefunktion einher (vgl. Hering et al., 2012). Häufig sind dabei Proteine der Tight Junction betroffen, die die parazelluläre Barriere regulieren, wie z.B. im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Zeissig et al., 2007; Amasheh et al., 2009a). Aber auch in diversen genetischen Erkrankungen wie dem familiären Hypomagnesiämie-Hypercalciurie-Nephrocalcinose-Syndrom (FHHNC, MIM 248250) (Kausalya et al., 2006; Günzel et al., 2009a) oder dem velo-cardio-fazialen Syndrom (VCSF) (Morita et al., 1999) spielen Mutationen oder Deletionen von Genen, die für Tight-Junction-Proteine kodieren, eine Rolle bzw. können als mitverursachende Faktoren identifiziert werden.

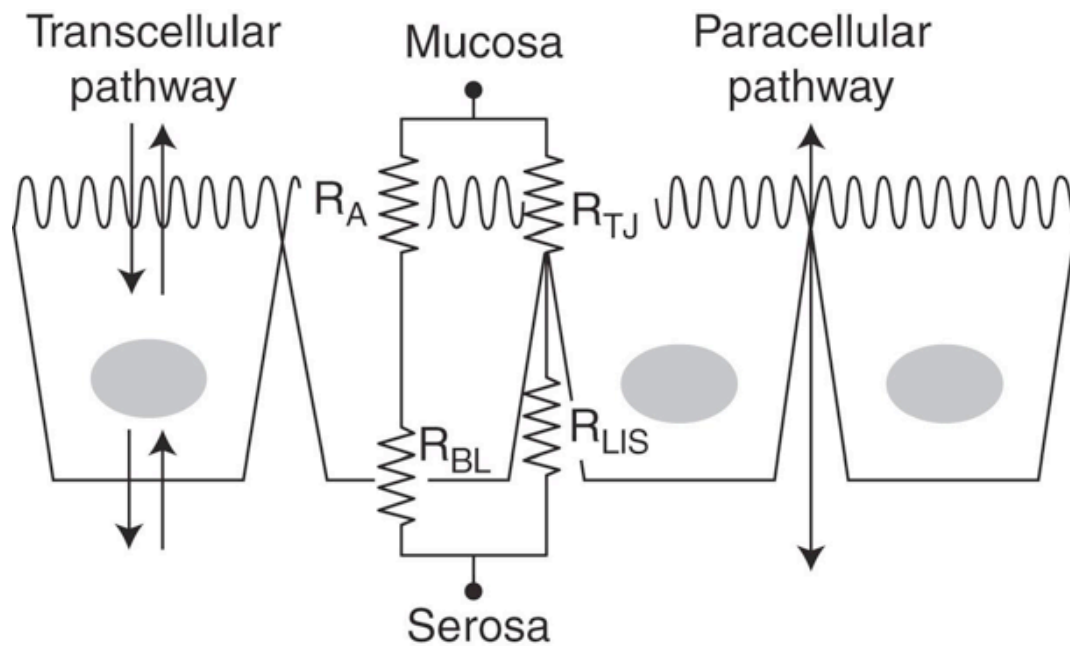


Abb. 4: Trans- und parazellulärer Weg. Elektrischer Ersatzschaltkreis der trans- und parazellulären Widerstände eines epithelialen Monolayers mit R_A (apikaler Widerstand), R_{TJ} (Widerstand der Tight Junction), R_{BL} (basolateraler Widerstand) und R_{LIS} (Widerstand des lateralen Interzellularspalts). Der transzelluläre Widerstand (Reihenschaltung aus R_A und R_{BL}) wird durch Transporter der apikalen und basolateralen Zellmembran kontrolliert und ist typischerweise höher als der parazelluläre Widerstand der parallelgeschalteten Widerstände der R_{TJ} . Somit wird der transepitheliale Gesamtwiderstand maßgeblich durch die TJ bestimmt. Theoretisch ist auch R_{LIS} in Reihe mit R_{TJ} geschaltet, der Beitrag zum parazellulären Widerstand kann jedoch vernachlässigt werden (Van Itallie & Anderson, 2009).

1.5 Tight Junctions: Regulatoren der parazellulären Passage

Bis dato wurden mehr als 40 verschiedene Tight Junction-Proteine identifiziert, die sich in verschiedene Proteinfamilien untergliedern lassen: die TJ-assoziierten MARVEL⁵-Proteine (TAMPs) Occludin⁶, Tricellulin (MarvelD2) und MarvelD3, JAM (Junctional Adhesion Molecule) und die Familie der Claudine⁷, die mehr als 24⁸ Mitglieder umfasst (Fromm, 2010; Anderson & Van Itallie, 2009; Schneeberger & Lynch, 2004; González-Mariscal et al., 2003; Dörfel & Huber, 2012; Mineta et al., 2011).

Die ersten expliziten Beschreibungen einer „verschließenden Struktur“ zwischen Epithelzellen tauchten jedoch bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts in der biologischen Fachliteratur auf (vgl. Anderson & Cereijido, 2001). Sie bezogen sich auf das lichtmikroskopisch identifizierbare Schlussleistennetz, das zu diesem Zeitpunkt noch als impermeable Barriere angesehen wurde (Bizzozero, 1870; Bonnet, 1895). Diese Undurchläss-

⁵ MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link

⁶ lat. *occludere*: verschließen, einschließen, zuschließen

⁷ lat. *claudere*: abschließen, verschließen, versperren

⁸ Bei Säugetieren und Vögeln sind bis zu 27 Claudine identifiziert, bei Fischen sind es deutlich mehr: im Kugelfisch sind sogar 56 Claudine beschrieben worden (Loh et al., 2004).

sigkeit konnte zu Beginn des 20. Jahrhunderts widerlegt werden, als eine parazelluläre Passage von Wassermolekülen, aber auch Makrophagen, nachgewiesen werden konnte (vgl. Anderson & Van Itallie, 2009).

Viele der heutigen Erkenntnisse zur epithelialen Barriere und somit auch zur TJ beruhen auf der elektrophysiologischen Pionierarbeit des dänischen Wissenschaftlers Hans Ussing und seiner Mitarbeiter. In den späten 1940er Jahren entwickelte Hans Ussing im Rahmen der Untersuchung epithelialer Transportvorgänge die später nach ihm benannte Ussing-Kammer, die nach wie vor ein zentrales Instrument elektrophysiologischer Experimente an epithelialen Zellverbänden ist. In einer Reihe von Studien an Epithelien der isolierten Froschhaut (Ussing & Zerahn, 1951; Koefoed-Johnsen & Ussing, 1958; Ussing & Windhager, 1964) wurde die Grundlage für unser heutiges Verständnis der physiologischen Kopplung von trans- und parazellulärem Transport geschaffen.

1.5.1 Funktion und Struktur der Tight Junctions (TJ)

Die Tight Junctions stellen eine selektiv-permeable Barriere dar, die sich gürtelförmig um die Zellen des Epithels zieht und den Interzellularspalt von 15-20 nm verschließt (Tepass, 2003). Gemeinsam mit den Adherens Junctions und Gap Junctions trennen sie den apikalen vom basolateralen Membrananteil und verhindern u.a. eine laterale Diffusion von Transportproteinen, Ionenkanälen und Pumpen innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembran (Rodriguez-Boulant et al., 1983; van Meer et al., 1986; Anderson & Van Itallie, 1995; Yamazaki et al., 2008). Die Polarität der Zellen, sowie die apikal zu basolateral abweichende Zusammensetzung der Membranproteine ist für die Funktion des Epithels elementar (Cereijido et al., 1998). Neben der Aufrechterhaltung der parazellulären Barriere spielen Tight Junctions auch eine Rolle in der Signaltransduktion (González-Mariscal et al., 2008; Van Itallie & Anderson, 2006), der Regulation von Transkription und Zellzyklus (Balda & Matter, 2007; Matter & Balda, 2009; Tsukita et al., 2008), sowie in der Vesikelrezirkulation (Yeaman et al., 2004).

Lichtmikroskopisch sind die TJs allerdings nicht darstellbar; auch elektronenmikroskopisch präsentieren sie sich nur als „kissing points“ (Tsukita et al., 2001) – punktuelle Verdichtungen der benachbarten Zellmembranen (Staehelein, 1973; Staehelein, 1974). Erst in Gefrierbruchschnitten zeigt sich die Tight Junction als anastomosierendes Netzwerk von Strängen und Fibrillen, das je nach Leckheit des Epithels mehr oder weniger dicht gestrickt erscheint (Claude & Goodenough, 1973).

1.5.2 Bizelluläre und trizelluläre Tight Junctions (bTJ und tTJ)

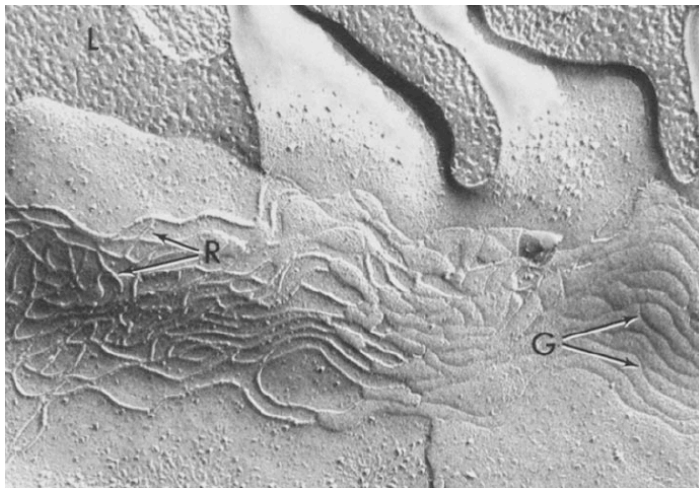
Die Permeabilität der Tight Junction wird nicht nur von der Zusammensetzung der Proteine beeinflusst, sondern ist auch von der Dichte und Komplexität des Maschenwerks abhängig.

Bizelluläre Tight Junctions (bTJs) dichten den Interzellularspalt zwischen zwei benachbarten Epithelzellen ab und machen den Großteil der Tight Junctions aus. Charakteristisch für die bTJ ist die horizontale Ausdehnung des Netzwerks und die Anzahl der Stränge, aber auch die Strangdichte. Ultrastrukturell lassen sich „breaks“ – Strangbrüche von mindestens 20 nm – sowie Strangstrukturen vom „continuous type“ bzw. „particle type“ unterscheiden.

Die trizelluläre TJ (tTJ) hingegen ist an den Eckpunkten dreier Epithelzellen lokalisiert. In Gefrierbruchschnitten zeigt sich, dass sich an den Kontaktpunkten dreier Zellen das TJ-Netzwerk nach basal ausdehnt und ein ca. 1 μm messendes „central tube“ – eine trizelluläre Zentralspore mit vertikal orientierten Strängen – ausbildet (Staehelin, 1973; Wade & Karnovsky, 1974; Walker et al., 1994).

Eine lokal erhöhte Permeabilität der tTJ für verschiedene Solute wurde im Rahmen von Untersuchungen am Tight Junction-Protein Tricellulin bestätigt (Staehelin et al., 1969; Walker et al., 1985; Ikenouchi et al., 2005; Krug et al., 2009a; Krug et al., 2013).

A



B

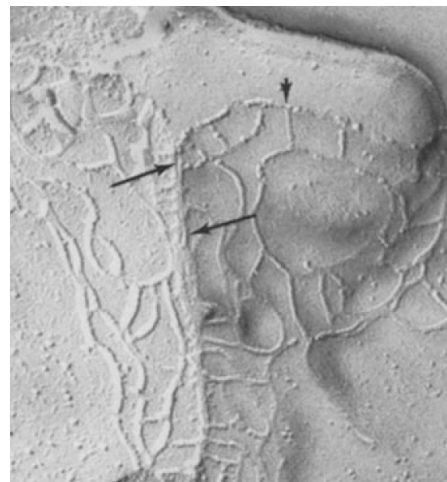


Abb. 5: Bi- und trizelluläre TJ. A: bTJ vom „continuous type“ mit *ridges* (R) und *grooves* (G), (Wade & Karnovsky, 1974b); B: tTJ mit sich nach basal ausdehnendem „central tube“ (Pfeile), (Wade & Karnovsky, 1974a).

1.5.3 Tight Junction-Proteine

Die Proteinzusammensetzung der Tight Junction ist komplex und variiert je nach Epithelientyp. Zusätzlich zu den Membranproteinen der TJ existieren weitere TJ-assoziierte Proteine, die über eine intrazelluläre Interaktion mit den Transmembranproteinen an Aufbau und Regulation der TJ beteiligt sind.

Die Membranproteine der Tight Junction lassen sich in verschiedene Proteinklassen unterteilen (vgl. Fromm, 2010; Dörfel & Huber, 2012): die TAMPs mit Occludin und Tricellulin, JAM (Junctional Adhesion Molecule) und die Familie der Claudine (mit über 24 bisher beim Menschen bekannten Vertretern) sind direkt am Aufbau der epithelialen Barriere beteiligt. JAM hat zusätzliche Funktionen in der Neubildung von Epithelien und bei der Translokation von Immunzellen. TJ-assoziierte, zytosolische Proteine wie ZO-1, ZO-2 und ZO-3 interagieren über spezifische Bindungsstellen mit den zytosolischen Regionen der Transmembranproteine. In immunhistochemischen Färbungen koloalisieren sie mit der TJ und werden als wichtige TJ-Marker angesehen (vgl. Furuse et al., 1993).

1.5.3.1 Occludin

Occludin konnte über eine Ko-Lokalisation mit dem TJ-assoziierten, zytosolischen Protein ZO-1 als erstes echtes TJ-Protein identifiziert werden (Furuse et al., 1993). Occludin besitzt vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen und drei intrazelluläre Domänen (vgl. Saitou et al., 2000). In der SDS-Gelelektrophorese stellt sich Occludin mit drei Isoformen zwischen 62 und 82 kDa dar, die aus einer Phosphorylierung an Serin-, Threonin- (Sakakibara et al., 1997; Wong, 1997; Wong & Gumbiner, 1997) und Tyrosinresten (Chen et al., 2002; Tsukamoto & Nigam, 1999) resultieren.

Occludin kann über das C-terminale Ende direkt mit F-Aktin interagieren (Wittchen et al., 1999), während andere TJ-Proteine für eine Aktin-Interaktion Scaffolding⁹-Proteine wie ZO-1 bis -3, PATJ oder MUPP1 benötigen. Auch die Regulation des Occludins könnte über diese C-terminale Region erfolgen, da *in vitro* u.a. eine Assoziation mit den regulatorischen Proteinen PKC- ξ , Non-Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Yes und Phosphatidylinositol-3-Kinase gezeigt werden konnte (Nusrat et al., 2000). Occludin kommt ubiquitär in allen Epithelien vor.

⁹ engl. scaffolding: (Bau-)Gerüst

Die genaue Rolle von Occludin innerhalb der TJ konnte bislang noch nicht identifiziert werden, doch ist die Funktion vermutlich deutlich komplexer als zuvor angenommen (Saitou et al., 2000). In Transfektionsversuchen an Occludin-negativen L-Fibroblasten induzierte die Anwesenheit von Occludin die Ausbildung TJ-ähnlicher Filamente, selbst wenn die Zellen diese Fähigkeit vorher nicht besaßen (Furuse et al., 1998). Der Verlust von Occludin in Occludin-Knockout-Modellen hatte elektrophysiologisch jedoch keinen Zusammenbruch der epithelialen Barriere zur Folge (Saitou et al., 1998, 2000; Schulzke et al., 2005). Histologisch zeigten sich allerdings Abnormalitäten wie chronisch-entzündliche Prozesse der gastralen Mukosa, cerebrale Kalzifizierung, testikuläre Atrophie und eine Substanzverringering der Knochenkompakta (Saitou et al., 2000). Die Überexpression von Occludin in Madin Darby Canine Kidney-(MDCK)-Zellen führte zu einem deutlich höheren Niveau des TER (McCarthy et al., 1996) bei gleichzeitiger Disruption der parazellulären Barriere mit erhöhter Permeabilität für Mikrosolute (Balda et al., 1996; Chen et al., 1997).

1.5.3.2 Claudine

Gegenwärtig sind bei Mammalia 27 verschiedene Claudine zwischen 20 und 27 kDa bekannt (Mineta et al., 2011). Claudine haben vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Loops und eine intrazelluläre Schleife (Tsukita & Furuse, 2000a).

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit mit den anderen Tetraspan-Proteinen Occludin und Tricellulin bestehen zu diesen keinerlei Sequenzhomologien. Die Sequenzhomologie der Claudine untereinander variiert mit Übereinstimmungen von 12,5 % bis 69,7 %, was zu einer Einteilung in klassische und nicht-klassische Claudine geführt hat (Krause et al., 2008). Hierbei ist der Grad der Sequenzhomologie innerhalb der klassischen Claudine deutlich ausgeprägter. Klassische sowie nicht-klassische Claudinen besitzen ein konserviertes Aminosäuremotiv (W-GLW-C-C¹⁰) in der ersten extrazellulären Schleife, und fast alle Claudine verfügen über ein C-terminales PDZ-Bindemotiv (PSD/Discs Large/ZO-1-Domäne), das die Interaktion mit zytoplasmatischen Scaffolding-Proteinen wie ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Itoh et al., 1999), MUPP1 (Hamazaki et al., 2002; Jeansonne et al., 2003) and PATJ (Roh et al., 2002) ermöglicht.

Auch wenn bislang noch nicht alle Claudine mit Funktion charakterisiert worden sind, zeichnet sich bereits ein breites Spektrum von Aufgaben ab, die primär die Modifikation

¹⁰ Trp-Gly-Leu-Trp-Cys-Cys

der epithelialen Barriere betreffen.

Claudin-1, -4 und -5 haben eine abdichtende Funktion innerhalb der TJ. Der Verlust von Claudin-1 als wesentlichem Bestandteil der epidermalen Tight Junction führte im Knockout-Modell zu letalem, transdermaletem Wasserverlust (Furuse et al., 2002).

Claudin-4 modifiziert vor allem die Ionenselektivität und trägt zur Komplexität der TJ bei (Colegio et al., 2002). Eine Überexpression resultierte in einem Abfall der Kationendurchlässigkeit bei unveränderter Anionenselektivität (Van Itallie et al., 2001). Claudin-5 ist für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und die Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt von Bedeutung (Nitta et al., 2003; Amasheh et al., 2005; Markov et al., 2010; Amasheh et al., 2010). Zudem konnte Claudin-5 in TJs pankreatischer Azinuszellen (Rahner et al., 2001), Schwannzellen (Poliak et al., 2002) und im Alveolarepithel (Wang et al., 2003) nachgewiesen werden. Auch in der Ontogenese wird Claudin-5 eine wichtige Rolle zugesprochen (Sirotkin et al., 1997; Kojima et al., 2002).

Claudin-2 verringert den transepithelialen Widerstand (Furuse et al., 2001) durch Bildung parazellulärer Kationenkanäle (Amasheh et al., 2002). Dabei wird Claudin-2 typischerweise in den lecken, proximalen Anteilen röhrenförmiger Epithelien exprimiert, wie dem proximalen Nierentubulus (Kiuchi-Saishin et al., 2002) und im Dünndarm (Markov et al., 2010). Die Regulation ist im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen verändert (Heller et al., 2005; Zeissig et al., 2007), wobei pro-inflammatorische Cytokine wie TNF- α eine Rolle spielen (Mankertz et al., 2009).

Von Claudin-10 sind verschiedene Spleißvarianten bekannt, die je nach Expressionshintergrund als anionen- bzw. kationenselektive Porenbildner beschrieben wurden (Van Itallie et al., 2006; Günzel et al., 2009b).

Auch Claudin-16 zählt zu den kanalbildenden Claudinen mit Selektivität für Mg^{2+} (Simon et al., 1999). Mutationen im Claudin-16-Gen stehen mit dem familiären Hypomagnesiämie-Hypercalciurie-Nephrocalcinose-Syndrom (FHHNC, MIM 248250) in Zusammenhang (Simon et al., 1999; Weber et al. 2000; Kausalya et al., 2006; Günzel et al., 2009a).

Zusätzlich besitzen die Extrazellulärschleifen einiger Claudine eine Regulationsfunktion über die Interaktion mit den Loops gegenüberliegender Claudine. Wechselwirkungen zwischen Claudin-3 und -1 bzw. Claudin-3 und -2, nicht aber zwischen Claudin-1 und -2 konnten beobachtet werden (Furuse et al., 1999).

1.5.3.3 Tricellulin

Tricellulin besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Occludin und verfügt ebenfalls über vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Loops und zwei intrazelluläre Domänen (Ikenouchi et al., 2005). Vier Isoformen (*Tric-a*, *Tric-a1*, *Tric-b* und *Tric-c*) wurden identifiziert (Riazuddin et al., 2006), mit einem Molekulargewicht zwischen 51 und 64 kDa. Ebenso wie Occludin kommt Tricellulin ubiquitär in allen Epithelien vor und ist, anders als der Name suggeriert, nicht nur Bestandteil trizellulärer TJs, sondern in geringerem Maße auch in bizellulären TJs vertreten (Ikenouchi et al., 2005). In der trizellulären TJ zeigt sich jedoch die besondere Funktion von Tricellulin für die epitheliale Permeabilität von Makromolekülen (Krug et al., 2009a; Krug et al., 2013). In Überexpressionsexperimenten mit *Tric-a* führte eine starke Überexpression sowohl in bTJs als auch in tTJs zu einem Anstieg des TER, der mit einer verringerten Permeabilität für Ionen und Makrosolute einhergeht (Krug et al., 2009a). Im Gegensatz dazu hatte eine isolierte Überexpression von Tricellulin nur in tTJs weder eine Änderung des TER, noch eine verringerte Ionenpermeabilität zur Folge, führte jedoch zur deutlichen Abnahme der Durchlässigkeit für Makromoleküle (Krug et al., 2009a). Mutationen in *Tric-a* verursachen nicht-syndromale Taubheit (DFNB49) (Riazuddin et al., 2006; Chishti et al., 2008).

1.5.3.4 Junctional Adhesion Molecule (JAM) und CAR

JAMs gehören, anders als Occludin, Tricellulin und die Claudine, nicht zu den Tetraspan-Proteinen und haben nur eine einzelne Transmembrandomäne (Martin-Padura et al., 1998). Zusätzlich zu ihrem Vorkommen in der TJ finden sie sich auch in Leuko- und Thrombozyten und vermitteln den Zellkontakt mit dem Endothel bzw. anderen Leuko- oder Thrombozyten. Dort sind sie auch an der Bindung von Viren und der Angiogenese beteiligt.

Dennoch werden JAMs zu den Tight-Junction-Proteinen gezählt und sind für die Neubildung von Tight Junctions mitverantwortlich (Ebnet et al., 2004).

Die JAM-Proteine lassen sich abhängig von der Länge des cytoplasmatischen C-Terminus und der Bindungsmotive in zwei Untergruppen teilen. JAM-A, JAM-B und JAM-C einerseits, sowie CAR (coxsackie und adenovirus receptor), ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) und JAM-4 andererseits.

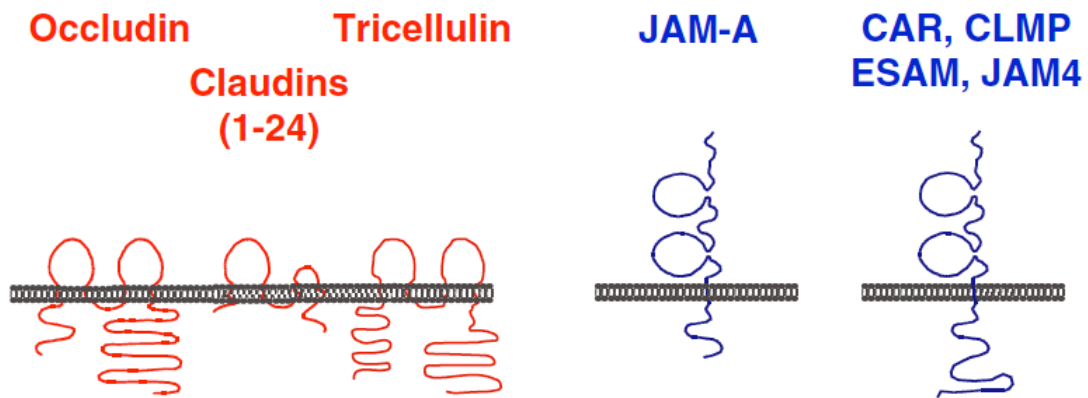


Abb. 6: TJ-Proteine. Occludin, die Claudine und Tricellulin gehören zu den Tetraspaninen mit vier transmembranären Domänen, während JAM, CAR u.a. nur über eine einzige Transmembrandomäne verfügen (Ebnet, 2008).

1.5.3.5 MarvelD3

MarvelD3 konnte 2009 als ein weiteres Tetraspan-Protein mit Vorkommen in der Tight Junction identifiziert werden (Steed et al., 2009). Benannt nach der Marvel-Domäne, die ursprünglich als strukturelles Motiv in für Membranapposition und -fusion zuständigen Proteinen beschrieben wurde (Steed et al., 2009), kann MarvelD3 in eine gemeinsame Proteinfamilie mit Occludin und Tricellulin, die TJ-assoziierten Marvel-Proteine (TAMPs), eingeordnet werden (Raleigh et al., 2010). MarvelD3 wird bei Säugetieren in zwei verschiedenen Spleißvarianten exprimiert. Beide Isoformen konnten ubiquitär in verschiedenen Epithelien und Endothelien nachgewiesen werden (Steed et al., 2009). In intestinalen Epithelien ko-lokalisiert MarvelD3 mit Occludin in TJs. In RNA-Interferenz-Experimenten bildeten sich auch ohne eine reguläre Expression von MarvelD3 funktionelle Tight Junctions heraus. Bei einer Depletion von MarvelD3 resultierten jedoch Monolayer mit deutlich erhöhtem TER (Steed et al., 2009). Die genauen Funktionen von MarvelD3 sind noch nicht komplett erfasst, aber verschiedene Experimente weisen daraufhin, dass MarvelD3 partiell den Funktionsverlust von Occludin und Tricellulin kompensieren kann und mit diesen Proteinen überlappende, zum teil redundante Aufgaben erfüllt (Raleigh et al., 2010).

1.5.4 Tight Junction-assoziierte Proteine

Zusätzlich zu den eigentlichen TJ-Proteinen sind weitere, sogenannte Plaque- oder Scaffolding-Proteine mit der Tight Junction assoziiert, die mit den Tight Junction-

Proteinen über deren zytosolische Domänen kommunizieren und somit die Struktur und Funktion der Tight Junction mitbeeinflussen (Yeaman et al., 1999). Die intrazellulären Plaque-Proteine erkennen die TJ-Proteine über eine PDZ-Domäne, die spezifisch mit Glu-Ser/Thr-Asp-Val interagiert (González-Mariscal et al., 2003). Die meisten der Claudine verfügen über ein PDZ-bindendes Motiv (Krause et al., 2008). Ausnahmen sind Claudin-12 und Claudin-22. Viele der Plaque-Proteine erfüllen regulierende Aufgaben bzw. vermitteln über Aktin- oder Myosinfibrillen eine Interaktion mit dem Zytoskelett. Entsprechend werden sie auch als Scaffolding-, also „Gerüst“-Proteine bezeichnet. Zu ihren Vertretern gehören unter anderem die Proteine der MAGUK-Familie ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Stevenson et al., 1986; Jesaitis et al., 1994; Haskins et al., 1998; Itoh et al., 1999; Roh et al., 2002a), sowie PAR (Itoh et al., 2001; Johansson et al., 2000; Izumi et al., 1998), PATJ (Roh et al., 2002b) und MUPP1 (Hamazaki et al., 2002). Eine ausführliche Übersicht über weitere Tight Junction-assoziierte Proteine findet sich bei González-Mariscal et al., 2003.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die mittelkettige Fettsäure Laurat (C12) und das xenobiotische Peptid Melittin auf die jeweiligen Eigenschaften und eine Eignung als Absorptionenhancer (AE) hin zu untersuchen.

Zu diesem Zweck sollte zunächst die Wirkung verschiedener Konzentrationen der beiden Substanzen auf den transepithelialen Widerstand in elektrophysiologischen Pilotexperimenten untersucht werden. Ein Zellviabilitätstest sollte der Ermittlung einer physiologischen Konzentration dienen, um eine Toxizität für das Epithel auszuschließen. Effekte auf den transepithelialen Widerstand sollten anschließend auf einen Dosis-Wirkungs- und Zeit-Reversibilitäts-Zusammenhang hin untersucht werden. Im Rahmen einer Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie sollten die jeweiligen Veränderungen des para- und transzellulären Anteils des TER analysiert werden. Zur Bestätigung der parazellulären Veränderungen von R^{para} wurde der Nachweis einer permeabilisierenden Wirkung in Fluxexperimenten angestrebt und eine Größenselektivität der Permeabilität untersucht. Experimente mit Inhibitoren bekannter Signalwege der TJ-Regulation sollten die Effekte der AEs abschwächen und somit einen Aufschluss über die Signaltransduktion geben.

Um phänomenologische Veränderungen im transepithelialen Widerstand auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen, sollte die Proteinexpression der AE-exponierten Zellen sowohl im Gesamtlisat als auch in der Membranproteinfraktion analysiert werden. In immunhistochemischen Färbungen sollten mögliche Effekte der AEs auf die Lokalisation von Tight Junction-Proteinen identifiziert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

1286 Electrochemical Interface	Solartron-Schlumberger, Farnborough, UK
402 Frequency Response Analyzer	Beran Instruments, Gilching
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Biorad, München
Begasungsbrutschrank, B 5060, EC/CO ₂	Heraeus, Hanau
Fluoreszenz-Spektrometer Spektramax	Gemini Molecular Devices, Ismaning
Fluorometer Tecan Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Heizblock	Grant, Berlin
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss, Berlin
Lumineszenzbild-Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
pH-Meter, Typ 761	Nick, Berlin
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Mini-Trans-Blot-Transferzelle	Biorad, München
Mini-Protean-3-Elektrophoresesystem	Biorad, München
Plattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Crailsheim
PSM 1700 Psimetric phase sensitive Multimeter	N4L, Arlington Heights, IL, USA
Speed Vac	Uniequip, Martinsried
Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
Ussing-Kammern	Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
Vortexgerät	Pharmacia, Freiburg
Wasserbad SW 21 / TWB 5	Julabo, Selbach
Widerstandsmessgerät (Chopstickelektrode)	Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
Wippe	Fröbel Labortechnik, Lindau
Zentrifugen	Hermle z233MK, Wehingen Eppendorf 5414C, Köln Beckman Avanti J25, Unterschleißheim, Lohhof

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

15 ml PPN-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml PPN-Röhrchen	Nunc, Karlsruhe
Magnetrührfische	Merck, Berlin
Mikrotiterplatte 96 Loch	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	Menzel/Glaser, Braunschweig
PCF-Filter (Millicell-HA, 0,6 cm ²)	Millipore, Schwalbach
Pipetten	Eppendorf, Köln
PVDF-Transfer-Membranen	Perkin Elmer, Weiterstadt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Köln
Sarstedt-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Standardtips 10, 20, 1000 µl	Eppendorf, Köln
Zell- und Gewebekulturschalen	Nunc, Karlsruhe
Zellschaber	Costar, Corning, NY, USA

3.1.3 Chemikalien

[³ H]-Mannitol	Biotrend, Köln
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse-Antikörper	Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit-Antikörper	Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Anti-β-Aktin-Antikörper	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti-Claudin-Antikörper	Invitrogen, San Francisco, CA, USA
Anti-Occludin-Antikörper	Invitrogen, San Francisco, CA, USA
Anti-Rb-IgG-POD-Antikörper	Roche, Mannheim
Anti-Tricellulin-Antikörper	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti-ZO-1-Antikörper	Zymed, San Francisco, CA, USA
BCA-Protein Assay Reagenz A + B	Pierce, Rockford, IL, USA
β-Mercaptoethanol	Clontech, Heidelberg

Bromphenolblau (Laemmli)	Amersham, München
BSA	NEB, Beverly, MA, USA
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos's Minimum Essential Medium	Biochrom, Berlin
Dulbecco's PBS mit Mg^{2+}/Ca^{2+}	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Dulbecco's PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
EDTA	Serva, Heidelberg
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
FITC-Dextran (4 kDa)	Sigma, Taufkirchen
FKS	Biochrom, Berlin
Fluorescein	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Serva, Heidelberg
Glycerol	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Low Melt Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
LumilightPLUS Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magermilchpulver	Werk Zapfendorf
Magnesiumchlorid	Merck, Berlin
Melittin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Berlin
Natriumlaurat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Berlin
Peroxidasesubstrat	QuanteBlue Pierce, Rockford, Illinois
Plus-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Marker PageRuler	Fermentas, Leon-Rot
Pro Tags Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde

RPMI	Sigma Aldrich, Taufkirchen
SDS	Merck, Berlin
SOC	Invitrogen, Karlsruhe
Sulpho-NHS-SS-Biotin	Sigma, Taufkirchen
TAE 50×	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Life Technologies
Tris	Merck, Berlin
Tris Base	Calbiochem, Bad Soden
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 / 0,5M pH 6,8	Biorad, München
Triton X-100	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Wasser	Fluka, Seelze
X-Gal	Life Technologies, Karlsruhe

3.1.4 Zelllinie HT-29/B6

In den Experimenten wurden epitheliale Zellen des Zellkulturmodells HT-29/B6 verwendet. HT-29/B6 ist ein Subklon der humanen Koloncarcinom-Zelllinie HT-29. Die Zellen wachsen konfluent als epithelialer Monolayer und verfügen über einen durchschnittlichen transepithelialen Ausgangswiderstand von ca. $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Kreusel et al., 1991). Die assoziierten Permeabilitätseigenschaften machen HT-29/B6 zu einem dichten Epithel.

3.1.5 Puffer und Lösungen

BSA-Blockierungslösung:

	5	g	BSA
	0.02	g	Natriumazid
ad	100	ml	PBS/Tween

Elektrophoresepuffer:

	500	ml	10x Westpuffer
	50	ml	10 % SDS
ad	5	l	Wasser

5 % Magermilchpulver in PBS:

	5	g	Magermilchpulver
ad	100	ml	PBS

5 % BSA in PBS:

	5	g	BSA
ad	100	ml	PBS

Gesamtlysepuffer:

	10	mM	Tris-HCl pH 7,5
	150	mM	NaCl
	0.5	%	Triton X-100
	0.1	%	SDS
pro	10	ml	Zugabe einer Tablette Complete (Roche)

Membranlysepuffer:

	2	ml	1 M Tris-Cl, pH 7,4
	500	µl	1 M MgCl ₂
	200	µl	0,5 M EDTA
	120	µl	0,5 M EGTA
ad	100	ml	Wasser
pro	10	ml	Zugabe einer Tablette Complete (Roche)

PBS/Tween:

	2	Stück	PBS-Tabletten
	1	ml	Tween 20
ad	1	l	Wasser

Ringerlösung # 111:

113.6	mM	NH ₄ Cl
2.4	mM	Na ₂ HPO ₄
0.6	mM	NaH ₂ PO ₄
21	mM	NaHCO ₃
5.4	mM	KCl
1.2	mM	CaCl ₂
1.2	mM	MgCl ₂
10	mM	D(+)-Glukose

Sammelgel:

9,8	ml	Sammelgellösung (bereits vorgemischt)
100	µl	10 % SDS
100	µl	10 % APS
10	µl	TEMED

1x TAE:

40	mM	Tris-Acetat, pH 8,3
1	mM	EDTA

Transferpuffer:

	100	ml	10 × Westpuffer
	100	ml	Methanol abs.
ad	1	l	Wasser

Trenngel (8,5 %):

5,6	ml	Acrylamidlösung
10,1	ml	Wasser
4,7	ml	1,5 M Tris, pH 8,8

200	μl	10 % SDS
200	μl	10 % APS
10	μl	TEMED

Trenngel (12,5 %):

8,2	ml	Acrylamidlösung
7,1	ml	Wasser
4,7	ml	1,5 M Tris, pH 8,8
200	μl	10 % SDS
200	μl	10 % APS
10	μl	TEMED

10x Westpuffer:

	144	g	Glycin
	30,4	g	Tris
ad	1	l	Wasser
pH	8,1 – 8,4		

Die Ringerlösung der elektrophysiologischen Versuchsreihen wurde bei der Herstellung mittels NaOH auf pH 7,8 titriert. Eine Begasung mit einem 95:5-O₂-CO₂-Gemisch und eine Umgebungstemperatur von 37 °C gewährleisteten während der Versuche einen konstanten pH von 7,4.

3.2 Methoden

3.2.1 LDH-Assay zur Viabilitätsprüfung

Ist eine Zelle unphysiologischen Bedingungen ausgesetzt, kann es im Verlauf der zellulären Stressantwort durch einen Mangel an Kompensationsmechanismen zu einem Funktionseinbruch kommen, etwa durch Verlust der zellulären Barriere nach Einbruch des Membranpotentials. Infolgedessen werden vermehrt intrazelluläre Metabolite freigesetzt bzw. strömen aus. Dieser Effekt wird auch in der klinischen Diagnostik genutzt, um beispielsweise das Ausmaß des Zelluntergangs nach einem Herzinfarkt oder bei verschiedenen Lebererkrankungen zu bestimmen.

Die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) konnte negativ mit einer intakten Zellfunktion korreliert werden, so dass in der vorliegenden Arbeit LDH als Parameter für die Zellviabilität verwendet wurde: Je geringer die LDH-Freisetzung, desto besser ist die Toleranz der Zellen für die applizierte Substanz bzw. deren Dosis. Somit konnte die Toxizität der verwendeten Substanzen in ihren jeweiligen Applikationskonzentrationen überprüft und eine physiologische Dosis für die weiterführenden Experimente festgelegt werden. Artefakte durch Apoptose bzw. Zelllyse in Messungen des transepithelialen Widerstands sollten auf diese Weise so gut wie möglich ausgeschlossen werden.

Für die Viabilitätsprüfung wurden epitheliale Monolayer der Zellreihe HT-29/B6 in Millipore-Filtern verwendet. In Vorbereitung der LDH-Konzentrationsbestimmung wurde der Widerstand der Filter manuell mit einer Chopstickelektrode bestimmt; ein ausreichend hoher Widerstand wurde hierbei als Zeichen für eine intakte Epithelfunktion gewertet. Anschließend wurden die Filter mit den entsprechenden Konzentrationen der Substanzen (Melittin 0,3 / 1,0 / 3,0 μ M, Laurat 3,5 / 4,5 / 6 mM, Kontrolle mit Ringerlösung #111) für jeweils zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nun wurden ca. 500 μ l Überstand entnommen, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 5000 rpm über 2 Minuten zentrifugiert. Hiervon wurden 450 μ l in ein Sarstedt-Röhrchen pipettiert (Probe 1). Der Rest des Überstands wurde verworfen und die Filter auf einem Tissue abgetupft. Im nächsten Schritt wurden die Filter mit 2 % Triton X-100 (in RPMI und angewärmt) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden die Zelltrümmer mit einer Pipette vereinzelt, die Lysate in Eppendorf-Röhrchen überführt und nach obengenanntem Vorgehen (Zentrifugation, Pipettieren von 450 μ l Überstand) in Sarstedt-Röhrchen pipettiert (Probe 2). Pro Ansatz resultierten 2 Probenröhrchen, eines

mit der freigesetzten LDH aus dem Überstand vor Lyse (Probe 1), das andere mit dem Gesamtlysate, also auch der gesamten intrazellulär verbliebenen LDH (Probe 2). Die Gesamt-LDH vor Inkubation konnte nur indirekt bestimmt werden als Summe aus dem LDH-Gehalt der Proben 1 und 2. Die Probenröhrchen wurden durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Benjamin Franklin (UKBF) der Charité bzgl. ihres LDH-Gehalts analysiert.

Für die Bewertung wurde nach Erhalt der Ergebnisse der Quotient aus freigesetzter LDH (LDH_{frei}) vor Zelllyse/-permeabilisierung, aber nach Inkubation mit Substrat bzw. Ringerlösung #111, und Gesamt-LDH (LDH_{ges}), das sich zu Beginn intrazellulär befand, entsprechend

$$\frac{LDH_{frei}}{LDH_{ges} + LDH_{frei}}$$

gebildet. Das Ergebnis stellt den Anteil der freigesetzten LDH an der Gesamt-LDH dar und ist ein prozentualer Wert für die Toxizität.

3.2.3 Elektrophysiologie

3.2.3.1 Manuelle Widerstandsmessung mittels Chopstickelektroden

Messungen zur Bestimmung des initialen Widerstands oder im Rahmen einer Inkubation außerhalb der Ussing-Kammer wurden manuell mithilfe speziell für die Messung an Zellfiltern entwickelten Chopstickelektroden (Ing. grad. D. Sorgenfrei) durchgeführt. Die Chopstickelektroden bestehen aus zwei Messfühlern, die synchron ins Medium abgesenkt werden können. Zur Messung des transepithelialen Widerstands eines konfluent bewachsenen Zellfilters wird einer der Messfühler innerhalb, der andere außerhalb des Filters von oben in die den Filter ausfüllende und umspülende Lösung eingetaucht. Zur Korrektur wurde abermals ein Leerwert an einem zellfreien Filter ermittelt, der wiederum vom gewonnenen Messwert abgezogen wurde. Zwischen Messungen wurden die Chopstick-Elektroden durch Eintauchen in 96 % Ethanol gereinigt.

Substanzen wurden, soweit nicht anders beschrieben, apikal unter Konstanthaltung des Befüllungsvolumens der Filter hinzugegeben. Expositionszeiten von 30 min bzw. 2 h wurden je nach Versuchsreihe eingehalten. In Reversibilitätsexperimenten fand, soweit nicht anders beschrieben, ein Auswaschen der Substanzen mit Ringerlösung #111 statt.

3.2.3.2 Kurzschlussstrom-Methode nach Ussing

Zur Bestimmung des aktiven Ionentransports (Kurzschlussstrom I_{SC} in $\mu\text{mol/h/cm}^2$) und des transepithelialen Widerstands R^t (TER) bzw. dessen Kehrwert, der Ionenleitfähigkeit G^t , von Epithelien eignet sich als etabliertes *in vitro*-Verfahren die Kurzschlussstrom-Methode nach Ussing (vgl. Ussing & Zerahn, 1951).

Im Versuchsaufbau ist ein Epithel zwischen zwei synchron mit 5 ml Medium (Ringerlösung #111) befüllten, auf 37 °C temperierten Kammern aufgezogen. Die Lösung in beiden Kompartimenten wird jeweils mittels kontinuierlicher Carbogen-Begasung (95 % O_2 , 5 % CO_2) durchmischt.

Durch eine spezielle Modifikation der Plexiglaskammern (Kreusel et al., 1991) können im Versuch auch kommerzielle Zellkulturfilter verwendet werden (Millipore, Schwalbach). Je zwei Dichtungsringe aus Gummi verhindern einen lateralen Fluss der Lösung über den Filterrand.

Die elektronischen Messungen an der Ussing-Kammer erfolgen über einen PC mit Mehrkanal-AD-Wandler, mit dem die Spannung über dem Epithel (U^{epi}) erfasst und die Elektroden im *closed* bzw. *open circuit* angesteuert werden können. Der transepitheliale Widerstand (*transepithelial resistance* TER bzw. R^t) kann über Spannungsänderungen (ΔV) berechnet werden, die durch Kurzschlussstromimpulse (50 μA , 0,3 s) eines weiteren externen Messverstärkers (CVC6 bzw. CVC8) induziert werden. Eine entsprechende Software (Analogon, Ing. grad. D. Sorgenfrei) ermöglicht die Steuerung des Programms, eine Anzeige der Messwerte und eine Registrierung der Parameter in vorgegebenen Zeitintervallen. Über ein pH-Meter findet eine kontinuierliche Messung des pH-Werts statt.

Zur Bestimmung des Kurzschlussstroms I_{SC} unter *closed circuit* - Bedingungen wird das Epithel zuvor auf 0 mV geklemmt.

Da es bereits durch die sich in den Kammern zwischen eingespanntem Epithel und Elektroden befindliche Flüssigkeit zu Änderungen in der Spannung und im Widerstand kommt, ist eine Korrektur der Messdaten notwendig. Entsprechend wurde vor Einbau der Zellfilter der Widerstand der flüssigkeitsgefüllten Kammern ohne Präparat und das Asymmetriepotential der Elektroden gemessen und der ermittelte Leerwert von den im Experiment gewonnenen Daten abgezogen.

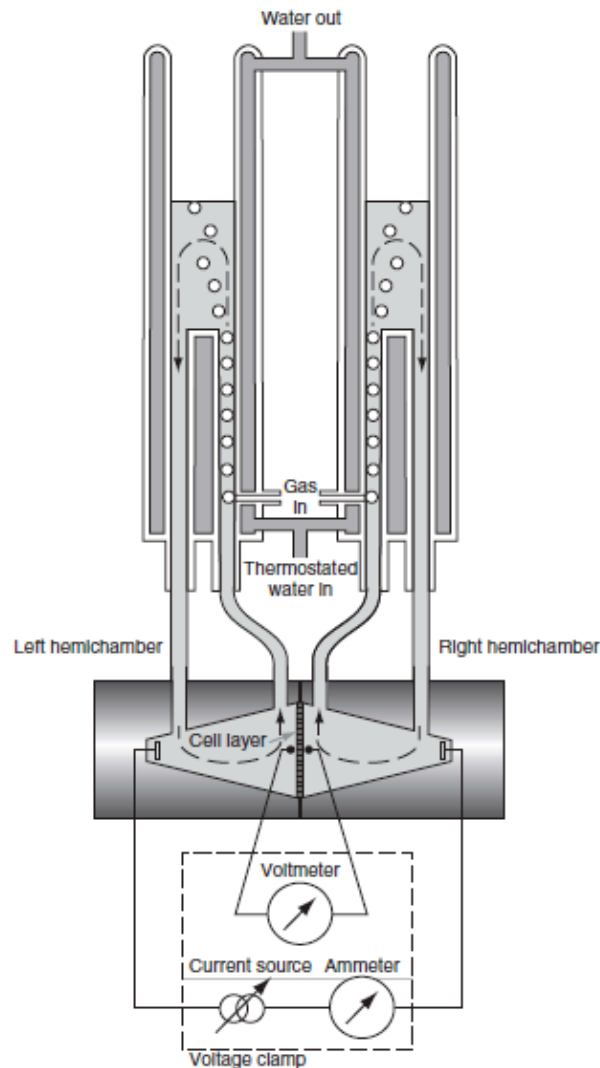


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer. Rechte und linke Kammerhälfte werden durch das Epithel voneinander getrennt, so dass eine apikale von einer basolateralen Seite unterschieden werden kann. Begasung und thermostatische Regulation gewährleisten eine Konstanzhaltung des Milieus. Ein Voltmeter ermöglicht die Messung des transepithelialen Widerstands, während sich über eine externe Stromquelle ein Kurzschlussstrom applizieren lässt (Günzel et al., 2010).

Im Anschluss an die Bestimmung des Leerwiderstandes sowie des Asymmetriepotentials wurden die Zellfilter in die Ussing-Kammer eingebaut und beidseitig synchron mit dem gleichen Volumen (5 ml Ringerlösung #111) befüllt. Nach Anlegen eines Stroms I über den Rechteckgenerator konnte die Potentialdifferenz aus U_1 und U_2 bestimmt und über Anwendung des Ohm'schen Gesetzes

$$R = \frac{U}{I}$$

der transepitheliale Widerstand R^t ermittelt werden. Aus dem somit berechneten Widerstand R^t sowie der direkt gemessenen transepithelialen Spannung U^{epi} lässt sich entsprechend auch der Kurzschlussstrom I_{SC} als Quotient aus Spannung und Widerstand bestimmen.

Substanzen wurden, soweit nicht anders beschrieben, apikal unter Konstanthaltung des Kammervolumens hinzugegeben. Je nach Versuchsreihe wurden Expositionszeiten von 30 min bzw. 2 h eingehalten. In Reversibilitätsexperimenten wurde, soweit nicht anders beschrieben, ein Auswaschen der Substanzen mit Ringerlösung #111 durchgeführt.

Spezifische Inhibitoren weiter unten beschriebener Signalwege (Kap. 4.1.8. bzw. 4.2.8.) wurden 30 min vor Applikation der AE hinzugegeben, um einen inhibitorischen Effekt zu gewährleisten.

3.2.3.3 Fluxmessungen parazellulärer Größenmarker

Die parazelluläre Passage unterschiedlich großer Moleküle über ein Epithel, die im Rahmen von Fluxmessungen ermittelt werden kann, gibt einen Hinweis auf die epitheliale Permeabilität. Die durchgeführten Fluxmessungen fanden alle in Ussing-Kammern statt, da durch die Begasung eine konstante Durchmischung der Badflüssigkeit gewährleistet wird, und somit eine Beeinflussung des Flux durch eine Entstehung von Grenzschichten aufgrund von Konzentrationsgefällen an den Passagestellen vermieden werden kann.

Nach Einbau der konfluent bewachsenen Zellkulturfilter, dem Befüllen der Kammerhälften mit je 5 ml Ringerlösung #111 und dem Erreichen konstanter Widerstände, wurde zu Beginn eine Leerwertprobe abgenommen. Hierzu wurden basolateral 300 μ l Badlösung entnommen und durch frische Ringerlösung #111 ersetzt. Anschließend wurden apikal 5 μ l Fluorescein (100 mM) appliziert. Zu den Zeitpunkten 10, 20, 30 und 40 min ab Fluoresceinzugabe wurden basolateral jeweils wieder 300 μ l entnommen und durch frische Ringerlösung #111 ersetzt. Photometrisch wurden anschließend bei einer Wellenlänge von 520 nm die Fluoresceinkonzentrationen der Proben am Spektrometer ermittelt und zur Berechnung der Fluxe verwendet.

Zur Berechnung des Flux fand folgende Formel

$$J = \frac{(c_2 - c_1) \cdot V_{Kammer}}{\Delta t \cdot A_{Filter} \cdot \left(\frac{V_{Zugabe}}{V_{Kammer}}\right)}$$

mit dem Flux J , den Konzentrationen c zu Zeitpunkt 1 und 2, der Zeitdifferenz Δt zwischen Zeitpunkt 1 und 2, sowie dem Kammer- bzw. Zugabevolumen V und der zugänglichen Fläche des Filters A Verwendung.

Aus dem Quotienten aus Flux und Konzentrationsdifferenz lässt sich somit unter Anwendung von

$$P = \frac{J}{\Delta c}$$

die Permeabilität P von Fluorescein bestimmen.

Die Bestimmung der Permeabilität für FITC-Dextran wurde auf ähnliche Weise durchgeführt wie für die Fluoresceinpermeabilität beschrieben. Allerdings wurde hierbei die Ussing-Kammer mit einer Ringerlösung #111 befüllt, die bereits 10 mM eines unmarkierten Dextrans gleicher Größe enthielt. Vor Versuchsbeginn wurde das FITC-Dextran (4 kDa) dialysiert, um Artefakte einer fälschlichen Mitanalyse kleinerer Dextranfragmente zu vermeiden. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120 min jeweils basolateral entnommen und mit gleichem Volumen der Ringerlösung #111 ersetzt. Die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 520 nm am Spektrometer, sowie die Berechnung von Flux und Permeabilität wurden auf gleiche Weise wie bei der Ermittlung der Fluoresceinparameter durchgeführt.

3.2.3.4 Permeationsanalyse mit Sulpho-NHS-SS-Biotin

Zur weiteren Analyse der größenselektiven parazellulären Molekülpermeation wurden Deckgläschen mit epithelialen Monolayern der Zelllinie HT-29/B6 nach AE-Exposition apikal mit Sulpho-NHS-SS-Biotin (606,7 Da) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit anti-ZO-1, einem Antikörper, der sich gegen das TJ-Scaffolding-Protein ZO-1 richtet. Antikörper- und Biotin-Signale wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in der lateralen (z-)Achse der Epithelzellen detektiert. Biotin-Signale wurden in Bezug zu bi- und trizellulären TJs gesetzt und ein Signal innerhalb bzw. unterhalb der TJ als Permeation gewertet. Nach anschließendem Washout detektierte Hintergrundsignale von im Interzellulärraum verbliebenen Biotin-Molekülen wurden im Sinne einer Detektabilität des verwendeten Markermoleküls gewertet.

3.2.3.5 Impedanzspektroskopie¹¹

Die Technik der Impedanzspektroskopie ermöglicht es, zwischen epithelialem und subepithelialem Widerstand zu differenzieren, die gemeinsam den Gesamtwiderstand (transepithelialer Widerstand R^t) ausmachen. Dabei beschreibt der epitheliale Widerstand R^{epi} die Impedanzeigenschaften des Epithels bzw. des epithelialen Monolayers an sich und der subepitheliale Widerstand R^{sub} die Eigenschaften der darunterliegenden Strukturen. Der transepitheliale Widerstand entspricht hierbei der Summe der Einzelwiderstände. Im Modell der Ein-Wege-Impedanz (1PI) sind R^{epi} und R^{sub} zueinander in Reihe geschaltet. Für die Zwei-Wege-Impedanz (2PI) wird der epitheliale Widerstand R^{epi} noch weiter in einen transzellulären Anteil R^{trans} und einen parazellulären Anteil R^{para} aufgegliedert. Diese sind zueinander parallelgeschaltet und befinden sich in Reihenschaltung zum subepithelialen Widerstand.

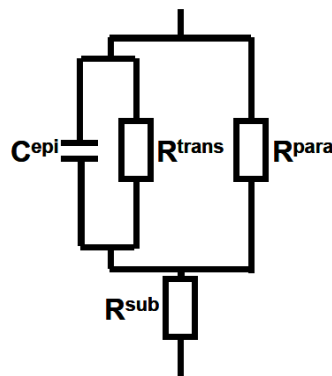


Abb. 8: Zwei-Wege-Impedanz. Im Gegensatz zur 1PI ist im Schaltkreis der 2PI der epitheliale Widerstand nochmals unterteilt in transzellulären Widerstand R^{trans} und parazellulären Widerstand R^{para} . C^{epi} ist in diesem Modell der epitheliale Kondensator (Krug, 2009b).

Zusätzlich wird bei der 2PI auch noch eine reversible Modifizierung des parazellulären Widerstands bewirkt. Dabei wird EGTA als Calcium-Chelator zugegeben, der spezifisch die für den parazellulären Weg maßgeblichen Tight Junctions öffnet und als Calciumswitch bezeichnet wird (Martinez-Palomo et al. 1980).¹²

Parallel zur Widerstandsmessung bei geöffneten Tight Junctions findet dabei auch eine Messung eines parazellulären Markerfluxes statt. Anhand der ermittelten Fluxe vor und nach EGTA-Gabe kann mit der Impedanzmessung vor und nach Tight-Junction-Öffnung der para- vom transzellulären Widerstandsanteil diskriminiert werden.

¹¹ Die Messungen und Auswertungen der Impedanzspektroskopie wurden von Dr. Susanne Krug durchgeführt (Krug et al., 2009b).

¹² Zwar wird durch den Calciumswitch auch die Adherens Junction beeinflusst, dies kann allerdings für unsere Berechnungen außer Acht gelassen werden, da diese nicht zum parazellulären Widerstand beiträgt.

Für die impedanzspektroskopischen Messungen wurden konfluent bewachsene Zellfilter mit epitheliale Monolayer in Ussing-Kammern eingebaut, deren Kammerhälften jeweils mit 5 ml Ringerlösung #111 synchron befüllt wurden. Die transepithelialen Potentiale wurden zwischen den Messungen auf 0 mV geklemmt. Während der Impedanzmessung wurde sequentiell sinusförmiger Wechselstrom ($35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) mit 42 verschiedenen Frequenzen zwischen 1,3 Hz und 16 kHz appliziert. Die hierdurch generierten Spannungsänderungen wurden mittels phasensensitiver Verstärker (402 frequency response analyzer, Beran Instruments; 1286 electrochemical interface, Solartron Schlumberger) gemessen und die Impedanzen aufgezeichnet. In zehnminütigem Abstand ab Einbau der Zellfilter wurden Impedanzspektren aufgezeichnet. Nach einer initialen Messung fand die Markerzugabe statt, an die im Anschluss regelmäßig Proben entnommen wurden. 30 min nach Fluoresceingabe wurde beidseits EGTA 1,3 mM zugefügt, wodurch ein Widerstandseinbruch verzeichnet werden konnte. Im Verlauf wurden weiterhin in zehnminütigen Intervallen Impedanzspektren aufgenommen.

Ähnlich wie in den Fluxexperimenten zur Berechnung der Permeabilität (siehe 3.2.3.3.) erfolgte die Probenentnahme, um die Passage des Markermoleküls zu ermitteln und die Ergebnisse mit den Impedanzmessungen zu korrelieren. Um die Impedanzspektroskopie jedoch nicht zu stören, fand die Entnahme jeweils im Intervall zwischen den Impedanzmessungen statt. Nach Abnahme eines initialen Leerwertes erfolgten die Entnahmen bei $t=10, 20, 30$ min. Nach der dritten Entnahme erfolgte die Zugabe des EGTA zur Öffnung der Tight Junctions und somit zur Erhöhung des parazellulären Fluxes. Vier weitere Probenentnahmen erfolgten in Zehnminutenintervallen. Die Konzentration des Markermoleküls wurde wie in 3.2.3.3. bestimmt und für die Fluxberechnung verwendet. Für die hier verwendete Zelllinie (HT-29/B6) wurde an anderer Stelle bereits Fluorescein als rein parazellulärer Fluxmarker identifiziert (vgl. Krug, 2009b), so dass von nur geringen Artefakten bei der Berechnung von para- und transzellulärem Widerstand ausgegangen werden kann.

Die Ermittlung von R^{para} fand unter Einbeziehung der Fluxverhältnisse des parazellulären Markers Fluorescein vor und nach EGTA-Gabe und der Informationen der Impedanzanalyse über den Vergleich der Widerstandsänderung in Bezug zur Fluxänderung statt.

3.2.4 Molekularbiologie

3.2.4.1 Western Blot

Die Proteinexpression der Epithelzellen (HT-29/B6) nach Inkubation mit den Absorptionenhancern wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. In einem ersten Ansatz wurden die Proteine des Gesamtllysats der Epithelzellen und in einem gesonderten Ansatz die isolierte Fraktion der Membranproteine betrachtet.

Die einzelnen Schritte der Proteinextraktion, Membranpräparation und des Western Blot-Verfahrens sind im Folgenden beschrieben.

3.2.4.2 Proteinextraktion aus epithelialen Monolayern

Für die Proteinextraktion aus den epithelialen Monolayern der Zellreihe HT-29/B6 wurden jeweils drei Zellfilter gepoolt aufbereitet um die Menge an detektierbarem Protein je Probe zu erhöhen. Vor Beginn der Proteinextraktion wurden die Zellfilter nach Absaugen des Mediums bereits 2 Stunden mit den entsprechenden Substanzen (Laurat 3,5 mM / Melittin 0,3 μ M / Kontrollen mit Ringerlösung #111) bei 37 °C in der Zellkultur inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Filter mit PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen des Überstands wurden 200 μ l PBS pro Zellfilter aufgetragen und die Zellen mit einem Cell-Scraper abgeschabt. Die aus je drei Zellfiltern gepoolte Zellsuspension wurde in Eppendorf-Röhrchen überführt und anschließend bei Raumtemperatur eine Minute lang bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

Die anschließenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. 500 μ l eiskalter Gesamtlysepuffer wurde zum Zellpellet in die Eppendorf-Röhrchen gegeben und mittels Vortex vermengt. Nach 30-60 Minuten Inkubation auf Eis und zwischenzeitlichem Vortexen wurden die Proben nochmals bei 4 °C und 15 000 x g 15 Minuten lang zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abgenommen und diesmal als Asservat zur Proteinquantifizierung und anschließenden Proteinbestimmung weiterverarbeitet.

3.2.4.3 Membran-Protein-Extraktion aus epithelialen Monolayern

In einem gesonderten Ansatz wurde statt der Aufbereitung des Gesamtproteins eine Membranproteinpräparation der Proben durchgeführt. Wie oben beschrieben fand zuvor nach Absaugen des Mediums aus den Zellfiltern (HT-29/B6) eine zweistündige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank mit den Absorptionenhancern bzw. der Kontrollen in Ringerlösung #111 statt. Alle folgenden Arbeitsschritte fanden auf Eis statt.

Nach abgeschlossener Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellfilter mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 100 µl Membranlysepuffer pro Filter zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Cell-Scraper abgeschabt und die Zellsuspension in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Dessen Inhalt wurde nun zehnmal durch eine Insulinnadel aspiriert und fünf Minuten lang bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in ein weiteres Eppendorf-Röhrchen überführt und 30 Minuten bei 43 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die gelöste Proteinfraction befand, wurde wieder abgenommen und in ein weiteres Eppendorf-Röhrchen überführt. Der verbliebene Zellpellet, der das membranständige Protein (*cold membrane fraction*) enthielt, wurde mit ca. 100 µl eiskaltem Membranlysepuffer vorsichtig wieder in Lösung gebracht. Die Proben wurden nun bei -80 °C asserviert und zur Proteinquantifizierung weiterverarbeitet.

3.2.4.4 Proteinquantifizierung (Pierce, BCA)

In eine Mikrotiterplatte wurden je 10 µl Probe zusammen mit 190 µl BSA-Gebrauchslösung pipettiert (200 µl Gesamtvolumen pro Vertiefung). Die Standardreihe wurde mit je 10 µl BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen mit 0,0 – 0,2 – 0,8 – 1,2 mg BSA/ml erstellt. Für die BSA-Gebrauchslösung wurden PIERCE BCA Protein Assay Reagenz A und Pierce BCA Protein Assay Reagenz B in einem Verhältnis von 20:1 angesetzt. Als Kontrolle dienten je 10 µl Lyse-Puffer.

Die beladene Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm versiegelt und bei 37 °C 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Tecan Spectra Classic die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

Aus den Werten der Standardreihe konnte durch lineare Regression eine Eichkurve erstellt werden, anhand derer sich die Proteinkonzentration der Proben ermitteln ließ. Hierfür wurde jeweils der Mittelwert aus zwei Ansätzen nach Abzug des Mittelwerts der Lyse-Puffer-Kontrollen gebildet.

3.2.4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese können die zuvor aus den Zellfiltern extrahierten Proteine in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt werden.

Die Methode der PAGE macht sich dabei das Prinzip zunutze, dass Moleküle entsprechend ihrer Größe, Molmasse und Ladung, aber auch abhängig von der Beschaffenheit des Trennmediums in einem elektrischen Feld zur Kath- bzw. Anode wandern. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei sowohl durch die angelegte Spannung, als auch

durch die Porengröße des Gels bedingt. Da der Gehalt an Polyacrylamid die Dichte des Gitters im Gel bestimmt, eignen sich höherprozentige Trenngele eher zur Auftrennung kleinerer Moleküle, geringerprozentige Trenngele zur Auftrennung größerer Moleküle.

In diesem Ansatz wurden 8,5 %- und 12,5 %-ige Trenngele und eine Mini-Protean-Apparatur verwendet.

Je zwei Glasplatten wurden durch einen 1,5 mm-Spacer voneinander getrennt in die Elektrophoresekammern eingebaut, mit Trenngel bis 1,5 cm unterhalb der Oberkante luftblasenfrei befüllt und 30 Minuten zur Polymerisation belassen. Eine 10 mm-Schicht absoluten Ethanol verhielt das Austrocknen des Gels. Nach Abgießen des Ethanol wurde ein Sammelgel auf das Trenngel aufpipettiert, mittels eines Kamms gekammert und 30 Minuten zur Polymerisation belassen. Nach Entfernen des Kamms wurden die entstandenen Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült und die Gele in die Elektrodenhalterungen der ebenfalls mit Elektrophoresepuffer befüllten Elektrophoresekammern eingebaut.

Die Proteinproben wurden mit Lysepuffer und 5 x Laemmli gemischt und abzentrifugiert. Bei 95 °C wurden die Proben fünf Minuten denaturiert und mit Natriumdodecylsulfat (SDS) markiert. Das SDS überlagert die Eigenladungen der Proteine und bewirkt, dass diese sich wie gewünscht, nach Molekülgröße, nicht aber entsprechend ihrer heterogenen Ladungsdichten, trennen.

Ein weiterer Kaleidoskop-Marker wurde bei 42 °C über zwei Minuten appliziert, bevor die Proben in die Elektrophoresetaschen des Sammelgels aufgetragen wurden.

Die anschließende Elektrophorese fand bei einer Spannung von 100 V über eine Dauer von 60 - 90 Minuten statt.

3.2.4.6 Elektrotransfer

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Proteine für die weitere Immundetektion vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen.

Die PVDF-Membran wurde hierfür ca. fünf Minuten in absolutem Ethanol angefeuchtet und anschließend mit Transferpuffer inkubiert. Danach wurden das Gel und die PVDF-Membran sowie zwei Schwämme und zwei Whatman-3MM-Filter fünf Minuten lang in Transferpuffer equilibriert und anschließend zu einem „Sandwich“ zusammengebaut (zuoberst ein klares Panel, Schwamm 1, Whatman-Filter 1, PVDF-Membran, Gel, Whatman-Filter 2, Schwamm 2, zuunterst ein schwarzes Panel). Das entstandene Sandwich wurde in die Elektrodenkammer eingesetzt und mit Kühlakku und Rührstäb-

chen versehen in die Pufferkammer eingebracht, die daraufhin mit Transferpuffer aufgefüllt wurde. Die komplette Apparatur wurde auf einen Magnetrührer gestellt und an die Stromversorgung angeschlossen. Der Transfer fand bei 100 V und konstantem Strom zwischen 0,2 und 0,4 A über die Dauer von 60 Minuten statt.

3.2.4.7 Immundetektion mit POD-konjugiertem Zweitantikörper

Mittels Immundetektion lassen sich auf einer Nylonmembran fixierte Proteine mit spezifischen Antikörpern nachweisen und verifizieren. Die getrocknete Membran wurde vor Beginn der Immundetektion kurz mit Ethanol befeuchtet und in PBS / Tween gespült. Im Anschluss wurde die Membran in einer Glasküvette in ca. 50 ml PBS / Tween / 5 % Magermilchpulver zwei Stunden lang bei Raumtemperatur blockiert bzw. über Nacht bei 4 °C. Dieser Schritt diente der Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen. Der Überstand wurde abgeschüttet, die Membran jedoch in der gleichen Glasküvette belassen (auch sämtliche Bindungsstellen des am Glas haftenden Proteins sollten hier blockiert sein) und mit PBS / Tween gespült. Dann erfolgte die Inkubation in ca. 50 ml PBS / Tween / 5 % BSA / 0,02 % NaAzid über zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C. Im nächsten Schritt fand die Inkubation mit dem 1. Antikörper in einem Verhältnis von 1:2000 statt. In mindestens 12,5 ml PBS / Tween / 5 % BSA / 0,02 % NaAzid wurde die Membran weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper auf einer Wippe inkubiert. Im Anschluss daran wurde sie 3 x 10 Minuten mit PBST gewaschen und dann in 15 ml PBST / 1 % Blocking Reagent mit dem 2. Antikörper (je nach 1. Antikörper Anti-Rabbit-Ak oder Anti-Mouse-Ak) 60 - 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert.

Nach weiteren Waschvorgängen (3 x 10 Minuten in PBS / Tween bei Raumtemperatur) wurde die Membran für fünf Minuten in einer Entwicklungslösung (Lumilight, Roche) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Transparentfolien in den Lumineszenz-Detektor LAS 1000 eingebracht. Dort wurde bei Expositionszeiten zwischen 30 Sekunden und fünf Minuten das bei der Spaltung des Lumilight-Substrats emittierte Licht detektiert und somit das spezifische Bandenmuster kenntlich gemacht.

3.2.4.8 Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Immunfluoreszenz basiert auf der spezifischen Bindung von Erst-Antikörpern an nachzuweisende Proteine im Zellverband. Diese Immunkomplexe können wiederum spezifisch von fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörpern gebunden wer-

den, die sich gegen die Fc-Domäne der proteinspezifischen Erst-Antikörper richten. Diese können im konfokalen Laser Scanning-Mikroskop dargestellt werden, da sie nach Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen ebenfalls Licht emittieren. Neben dem Nachweis einzelner Proteine eignet sich diese Methode auch zur Darstellung von Ko-Lokalisationen verschiedener Proteine, da im Rahmen von Doppelfärbungen verschiedene Antikörper gegen unterschiedliche Strukturen gleichzeitig verwendet werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen Occludin, Tricellulin und Claudine, sowie das TJ-assoziierte ZO-1 verwendet und mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit dargestellt. Auf diese Weise konnten die Tight-Junction-Proteine Occludin, Tricellulin, sowie verschiedene Claudine und ZO-1 nach Inkubation mit den Absorptionenhancern und in Kontrollen dargestellt werden, sowie ihre Lokalisation in Bezug zur Zellmembran gezeigt werden. Nuclei wurden mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) angefärbt, zur Darstellung von F-Aktin wurde FITC-Phalloidin verwendet.

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um epitheliale Monolayer der Zellreihe HT-29/B6 auf Deckgläschen (18 x 18 mm), die vor Beginn der Immunfärbung nach Absaugen des Mediums je 30 Minuten bzw. zwei Stunden mit den entsprechenden Substanzen (Laurat 3,5 mM und 4,5 mM / Melittin 0,3 μ M und 1 μ M / Kontrollen in Ringerlösung #111) bei 37 °C in der Zellkultur inkubiert wurden.

Nach Absaugen des Überstands wurden die Deckgläschen 2 x mit PBS (mit Mg^{2+} / Ca^{2+}) gewaschen und 15 Minuten mit auf 37 °C vorgewärmtem 1 % Paraformaldehyd (20 min bei 2 %) in PBS (pH 7,4) im Brutschrank inkubiert. Anschließend folgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}). Die Zellen wurden fünf Minuten in 25 mM Glycin in PBS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) wurde eine 15-minütige Permeabilisierung der Zellen mit 0,3 % Triton X-100 in PBS (7 min bei 0,5 %) durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5 % Goat-Serum blockiert. Im nächsten Schritt wurde 60 Minuten bei 4 °C mit dem Erst-Antikörper in 0,5 % Goat-Serum inkubiert. Nach zweimaligem Auswaschen mit 0,5 % Goat-Serum erfolgte die Inkubation zur Doppelfärbung mit einem weiteren 1. Antikörper, wie bereits oben beschrieben, und von zweimaligem Auswaschen mit 0,5 % Goat-Serum gefolgt.

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten im Dunkeln, um die fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörper zu schonen. 60 Minuten wurde bei 37 °C mit dem ersten Zweit-Antikörper (Goat-Anti-Rabbit 594 1:500) in 0,5 % Goat-Serum inkubiert. Dieser Vorgang wurde mit

dem zweiten Zweit-Antikörper (Goat-Anti-Mouse 488 1:500) für 60 Minuten bei 37 °C wiederholt. Nach zweimaligem Waschen mit 0,5 % Goat-Serum wurden die Deckgläschen kurz nacheinander mit Aqua bidest. und absolutem Alkohol abgespült und mit Pro Tags Mount Fluor eingedeckt. Das Aushärten fand bei Raumtemperatur im Dunkeln statt, die Darstellung der immungefärbten, fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte am konfokalen LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Jena, bei exzitatorischen Wellenlängen von 543, 488 und 405 nm.

3.2.5 Auswertung und Statistik

Die in dieser Arbeit verwendeten Dateitabellen, Abbildungen und statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung von Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft Powerpoint und Origin erstellt. Die Messwerte wurden als arithmetischer Mittelwert \pm SEM (Standard Error of the Mean) angegeben. Die Berechnung von Signifikanzen fand mittels *Student's t-Test* und Bonferroni-Holm-Methode statt, wobei ein p-Wert $<0,05$ als signifikant gewertet wurde (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von Laurat

Die Widerstandsmessungen (sowohl manuell als auch mittels Ussing-Kammer) wurden zum Nachweis eines Effektes von Laurat auf die Epithelien durchgeführt. Initial wurden verschiedene Konzentrationen der Substanz getestet und ihr Effekt auf den Widerstand und auf eine Reversibilität der Veränderung hin analysiert.

Messungen des initialen transepithelialen Widerstands konfluenter Monolayer zeigten Ausgangswerte von $317,4 \pm 24,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=28).

4.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

In Abhängigkeit von der apikalen Konzentration des Laurats stellte sich eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung der Effekte dar. Während in Kontrollen nach zweistündiger Inkubation mit Ringerlösung #111 keine signifikante Veränderung des TER zu verzeichnen war ($95,66 \pm 2,08$ % des initialen Widerstands (n=10)), kam es bei einer apikalen Konzentration von 3,5 mM Laurat zu einem Abfall des TER auf $52,4 \pm 12,33$ % des Initialwerts (n=10). 4,5 mM Laurat apikal führte zu einem Absinken des TER auf $24,87 \pm 4,13$ % des Initialwerts (n=4) und 6 mM Laurat senkte den TER auf $11,31 \pm 1,28$ % des Initialwerts (n=4).

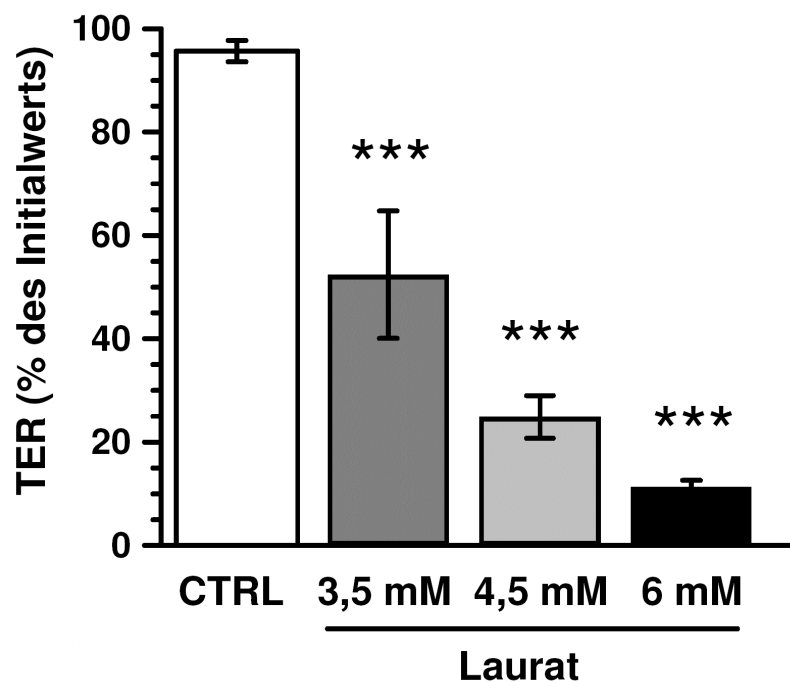


Abb. 9: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Laurat. Zweistündige Inkubation mit Laurat in den Konzentrationen 3,5 mM (n=10), 4,5 mM (n=4) und 6 mM (n=4) führte zu deutlichen, konzentrationsabhängigen Veränderungen des TER im Vergleich zu Initialwerten (***p < 0,001). Kontrollen (CTRL) zeigten stabile TER-Werte im Verlauf (n=28).

4.1.2 Zeit-Reversibilitäts-Beziehung

Nach zweistündiger Exposition mit 3,5 mM Laurat und anschließendem Auswaschen der Substanz zeigte sich eine deutliche Zeitabhängigkeit der Wirkung auf den transepithelialen Widerstand.

Initiale Messungen ergaben transepitheliale Widerstände mit Werten von $376,95 \pm 9,07 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für Kontrollen (n=12), bzw. $378,9 \pm 21,92 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für die Lauratgruppe (n=12). Kontrollen blieben nach initialem Absinken ihres TER auf einem stabilen Niveau bei $89,27 \pm 1,99 \%$ des Ausgangswerts nach 240 min (n=12).

Nach Applikation von 3,5 mM Laurat kam es im Verlauf zu einem Absinken des TER auf $70,74 \pm 2,47 \%$ des Initialwerts nach 30 min ($***p < 0,001$), bzw. $63,01 \pm 3,73 \%$ des Initialwerts nach 60 min ($***p < 0,001$). Bei 120 min erreichte der TER sein Minimum mit $49,37 \pm 0,53 \%$ des Initialwerts ($***p < 0,001$). Nach Auswaschen der Substanz konnte eine Erholung mit Anstieg des TER auf $55,37 \pm 1,24 \%$ des Initialwerts innerhalb von 240 min beobachtet werden (n=12).

In einem gesonderten Ansatz mit zweistündiger Lauratinkubation in Medium zeigte sich nach 20 h eine Rückkehr auf $89,22 \pm 10,48 \%$ des Initialwerts (n=4).

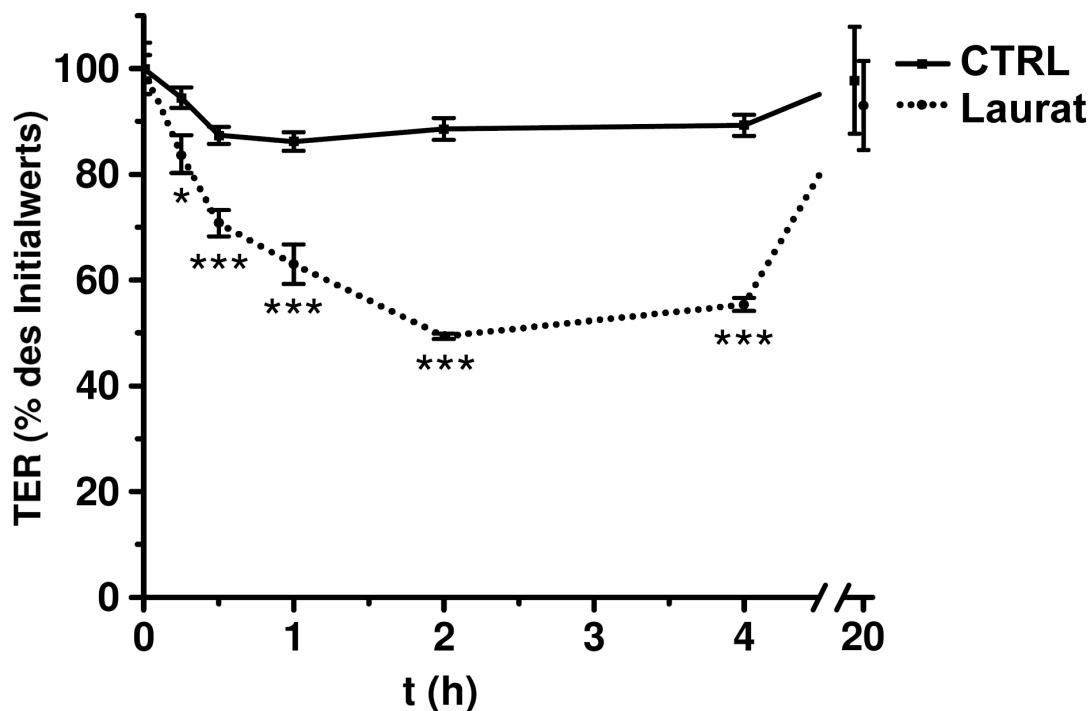


Abb. 10: Zeit-Reversibilitäts-Beziehung von Laurat. Unter zweistündiger Inkubation mit 3,5 mM Laurat zeigten sich im Verlauf von 240 min deutliche, zeitabhängige Effekte. Initial kam es zu einem Absinken des TER im Vergleich zu Initialwerten ($***p < 0,001$). Nach Auswaschen des Laurats nach 120 min erfolgte ein Wiederanstieg des TER mit Aufwärtstrend (n=12). Kontrollen blieben nach initialem Absinken ihres TER konstant (n=12).

4.1.3 Zellviabilitätsmessung mittels LDH-Assay

Zum Ausschluss toxischer Effekte des Laurats wurde sowohl unter Kontrollbedingungen mit Ringerlösung #111 als auch unter zweistündiger Exposition mit verschiedenen Konzentrationen von Laurat ein LDH-Freisetzungs-Assay durchgeführt. In diesem Assay wird die Aktivität des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Extrazellulärraum – in diesem Falle im Medium bzw. Zellüberstand – nachgewiesen. Unter zytotoxischen Bedingungen wird LDH vermehrt freigesetzt und gilt somit als Marker für den Grad der Zellschädigung.

Nach zweistündiger Inkubation mit Ringerlösung #111 zeigten Kontrollen eine LDH-Freisetzung von $0,32 \pm 0,02$ % des totalen LDH-Gehalts ($n=4$).

Bei einer Konzentration von 3,5 mM Laurat kam es zu einer nicht signifikanten Freisetzung mit $0,62 \pm 0,2$ % der Gesamt-LDH (n.s., $n=4$). Unter Konzentrationen von 4,5 mM und 6 mM Laurat wurden $3,76 \pm 1,4$ % ($*p < 0,05$, $n=4$) bzw. $18,1 \pm 1,47$ % ($***p < 0,001$, $n=4$) der Gesamt-LDH freigesetzt (Abb. 15).

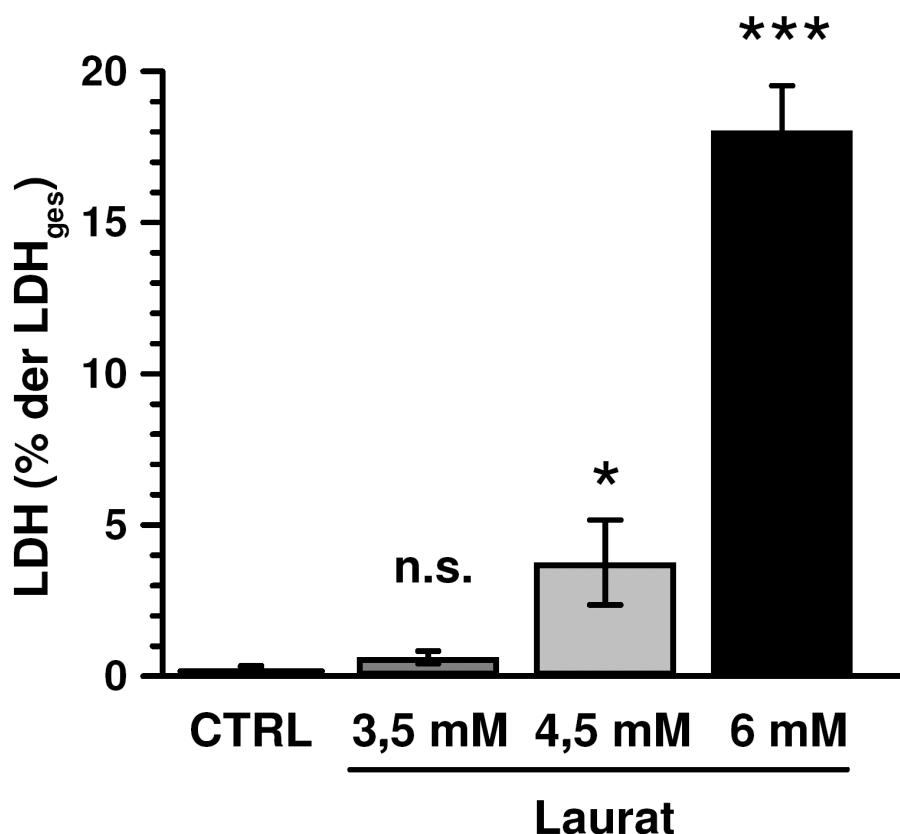


Abb. 11: LDH-Assay für Laurat. Nach zweistündiger Inkubation mit 3,5 mM, 4,5 mM und 6 mM Laurat zeigten sich dosisabhängige Unterschiede in der jeweiligen Freisetzung des zytosolischen Enzyms LDH in Prozent des Gesamt-LDH-Gehalts (n.s., $*p < 0,05$, $***p < 0,001$, jeweils $n=4$). Eine geringe Freisetzung wurde als Ausdruck intakter Zellviabilität gewertet.

4.1.4 Zwei-Wege-Impedanzmessung

Um zwischen transzellulärem und parazellulärem Anteil des Widerstands zu unterscheiden, wurde eine Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie (2-PI) bei einer Konzentration von 3,5 mM Laurat durchgeführt (Abb. 12). Kontrollen mit Ringerlösung #111 präsentierten einen durchgehend konstanten epithelialen Widerstand R^{epi} von $415,9 \pm 35,6 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ mit einem transzellulären Widerstand R^{trans} von $685,7 \pm 67,8 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ und einem parazellulären Widerstand R^{para} von $1264 \pm 208,8 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=7). Unter apikaler Zugabe von 3,5 mM Laurat kam es zu einer Abnahme des epithelialen Widerstands R^{epi} auf $210,2 \pm 17,7 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ nach Substanzzugabe ($***p < 0,001$, n=7), wobei sich der transzelluläre Widerstand R^{trans} nicht signifikant veränderte mit $731,8 \pm 202,7 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=7). Der parazelluläre Widerstand R^{para} sank hingegen deutlich ab auf $518,4 \pm 133,2 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ (*p < 0,01, n=7).

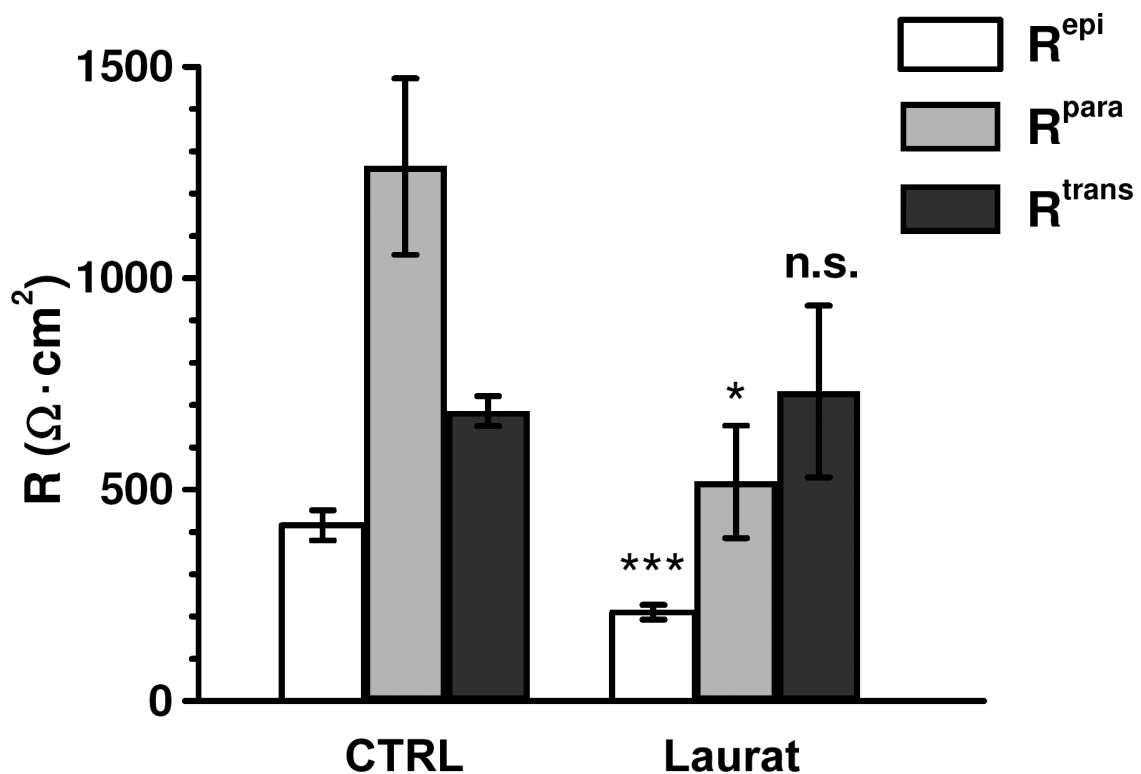


Abb. 12: Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie für Laurat. Die apikale Zugabe von 3,5 mM Laurat führte zu einem deutlichen Absinken des epithelialen Widerstands R^{epi} ($***p < 0,001$, n=7). Die 2PI-Analyse konnte zeigen, dass dieser Effekt über einen Abfall des parazellulären Widerstands R^{para} vermittelt wurde (*p < 0,01, n=7). Der transzelluläre Widerstand R^{trans} blieb auch nach Inkubation mit Laurat im Vergleich zu den Kontrollen konstant (n.s., n=7), was somit auf einen exklusiven Effekt des Laurats auf die parazellulären Barriereigenschaften hindeutet.

4.1.5 Markerflux-Experimente

4.1.5.1 Permeabilitäten von Fluorescein und FITC-Dextran

Zur Evaluation der Größenselektivität des parazellulären Weges wurden die Permeabilitäten von Fluorescein (330 Da) und FITC-Dextran (4 kDa) in unidirektionalen Flux-Experimenten analysiert.

Die Permeabilität für Fluorescein nahm in der mit 3,5 mM Laurat inkubierten Gruppe deutlich im Vergleich zur Kontrollgruppe zu (Abb. 13A). Die Permeabilität der Kontrollen für Fluorescein lag bei $0,09 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$ cm/s (n=8), während die der mit Laurat inkubierten Zellen bei $0,18 \pm 0,03 \cdot 10^{-6}$ cm/s (n=6, $**p<0,01$). Für FITC-Dextran (4 kDa) ließ sich jedoch keine signifikant erhöhte Permeabilität bestätigen (Abb. 13B). Kontrollen zeigten eine Permeabilität für FITC-Dextran (4 kDa) von $0,08 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$ cm/s (n=7). Für die mit Laurat inkubierten Proben stellte sich eine Permeabilität für FITC-Dextran (4 kDa) mit $0,064 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$ cm/s dar (n.s., n=7).

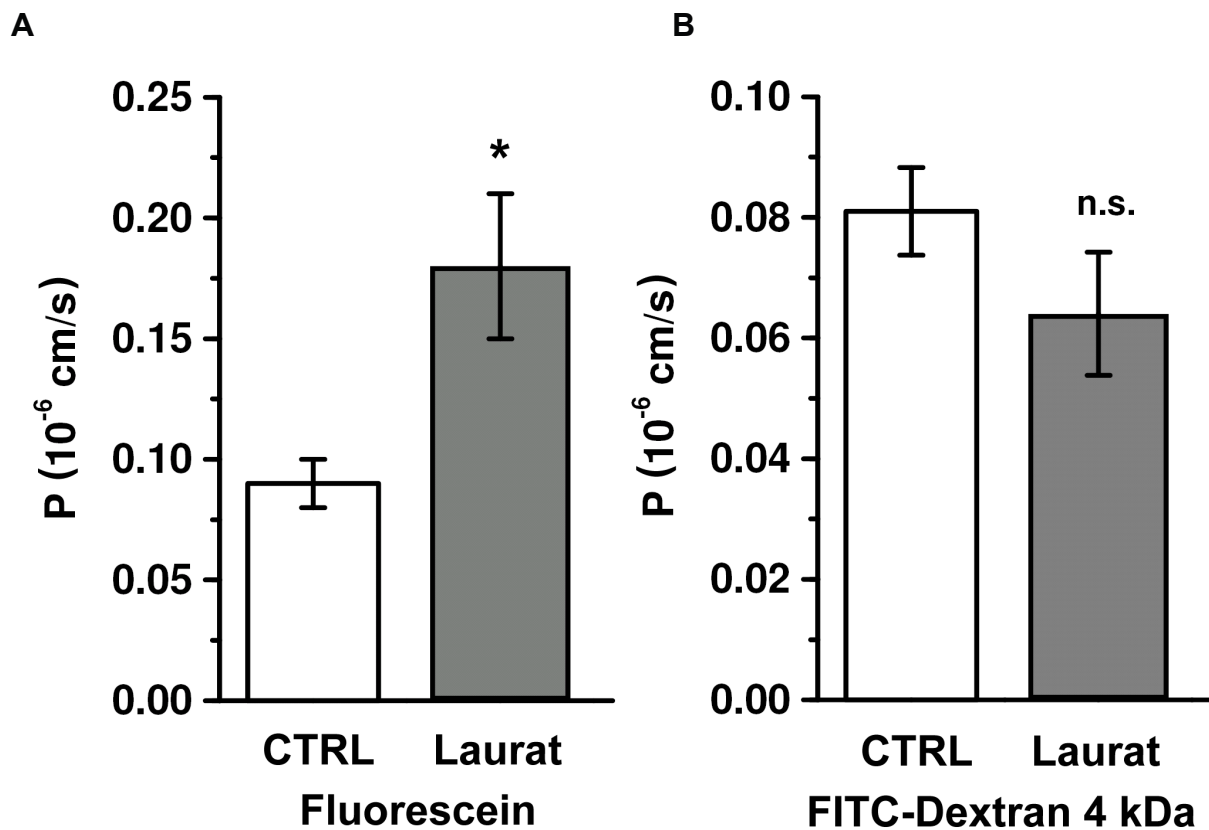


Abb. 13: Marker-Permeabilitäten für Laurat. Unter apikaler Gabe von 3,5 mM Laurat kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Permeabilität für Fluorescein ($**p<0,05$, n=6). Für FITC-Dextran 4 kDa ließ sich keine signifikante Erhöhung der Permeabilität nachweisen (n.s., n=7).

4.1.5.2 Permeabilität von Sulpho-NHS-SS-Biotin

Für die genauere Bestimmung und Eingrenzung einer Laurat-vermittelten Größenselektivität der parazellulären Permeabilität wurden Monolayer apikal mit Sulpho-NHS-SS-Biotin (606,7 Da) inkubiert und anschließend mit Anti-ZO-1-Antikörper gegengefärbt. Biotin ist in etwa doppelt so groß wie Fluorescein (330 Da) und wurde als Zwischenschritt im Größensprung zu FITC-Dextran (4 kDa) eingesetzt. Die konfokallasermikroskopische Analyse der lateralen (z-)Achse der epithelialen Zellen gab keinen Hinweis auf eine Permeation des Biotin-Signals nach inner- oder unterhalb bi-, bzw. trizellulärer Zellkontakte. Nach Washout waren noch vereinzelt Hintergrundsignale von im Interzellulärraum verbliebenem Biotin detektierbar, die im Sinne einer zuverlässigen Detektierbarkeit des Biotin-Signals gewertet wurden.

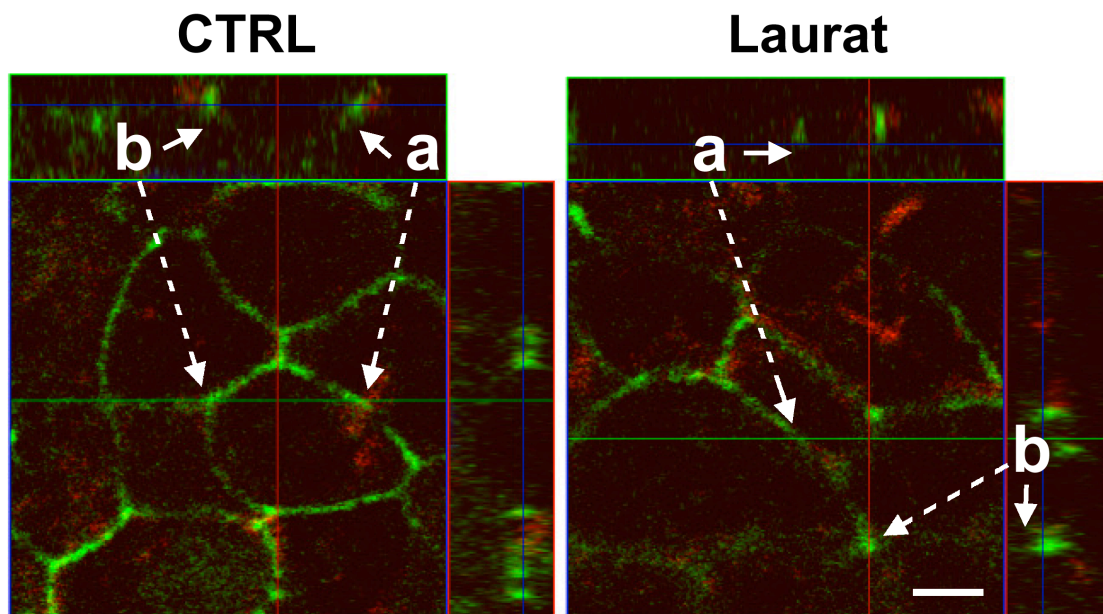


Abb. 14: Biotin-Permeabilität nach Lauratexposition. Es wurde keine verbesserte Permeabilität für den nicht-membrangängigen Marker Sulpho-NHS-SS-Biotin (606,7 Da) festgestellt. Weder inner- oder unterhalb bizellulärer (a, durchgezogener Pfeil) noch inner- oder unterhalb trizellulärer (b, durchgezogener Pfeil) TJs wurde in z-Scans der lateralen Zellspalten eine Signalverstärkung des Biotins (rot) mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie detektiert. Die gestrichelten Pfeile weisen auf die jeweilige Lokalisation der bi- bzw. trizellulären TJs in der Aufsicht von oben hin. Anti-ZO-1-Signal: grün, Balken: 5 μ m.

4.1.6 Western Blots

Für die Analyse eines Effektes auf die Proteine der Tight Junction wurden Western Blots von Gesamtprotein- und Membranproteinpräparationen konfluenter Zellmonolayer nach zweistündiger Inkubation mit 3,5 mM Laurat erstellt (n=6). Kontrollen wurden über zwei Stunden mit Ringerlösung #111 inkubiert (n=6).

Es ließen sich weder im Gesamtlysats noch in der Membranfraktion deutliche Veränderungen in den TJ-Proteinen Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, Occludin und Tricellulin im Vergleich zu den β -Aktin-Signalen der jeweiligen Präparationen feststellen (Abb. 15).

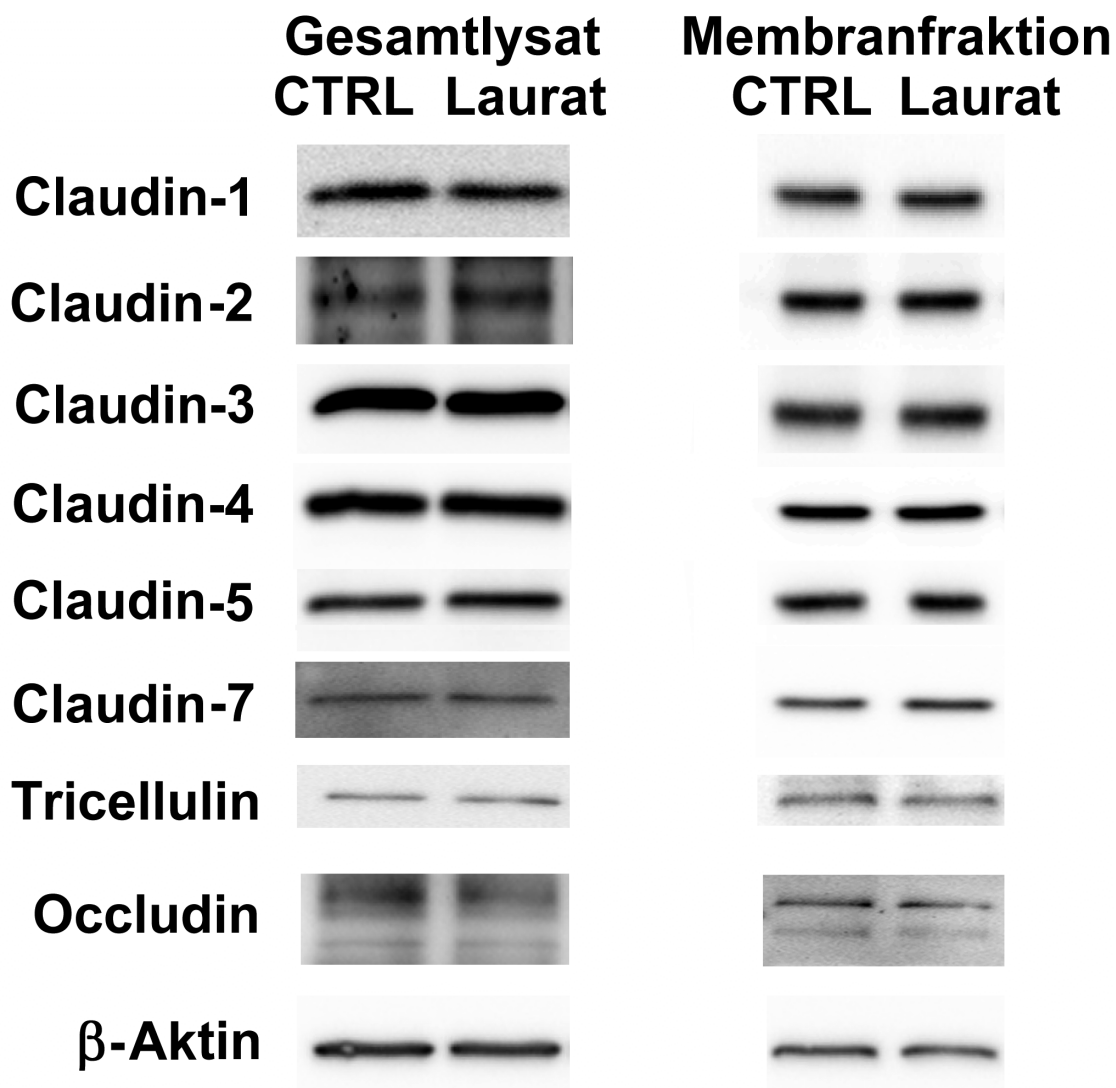


Abb. 15: Effekte von 3,5 mM Laurat auf die Proteine der Tight Junction in Western Blots. Eine Western Blot-Analyse von Gesamtlysats- und Membranfraktionproteinpräparationen zeigte keine deutlichen Effekte von einer 2 h-Lauratinkubation auf die Proteine der Tight Junction (n=6). Als Referenz dienten endogene β -Aktin-Signale. Die Sensitivität der Detektion einzelner Proteine variierte in beiden Ansätzen und wurde nicht als Indikation eines quantitativen Unterschieds zwischen den beiden Präparationsprotokollen gewertet.

4.1.7 Immunfluoreszenz

In immunhistochemischen Färbungen nach zweistündiger Inkubation mit 3,5 mM Laurat wurden die TJ-Proteine Occludin, Tricellulin, Claudin-1, -2, -3, -4, -5 und -7 sowie das Aktin-Myosin-Zytoskelett und die Zell-Nuklei dargestellt (n=4-6). Kontrollen wurden mit Ringerlösung #111 inkubiert (n=4). Eine Phalloidin-Färbung ergab keinen Hinweis auf eine detektierbare Beteiligung des Zytoskeletts an den Laurateffekten, da sich auch nach 2 h Inkubation mit 3,5 mM Laurat keine Veränderungen in der F-Aktin-Lokalisation zeigten (n=4, Abb. 16). Eine Kolokalisation der Claudine mit Occludin konnte sowohl in bi- als auch trizellulären Tight Junctions nachgewiesen werden, wohingegen Tricellulin vor allem in trizellulären Zellkontakten dargestellt werden konnte. Die immunfluoreszenz-mikroskopische Analyse der Färbungen zeigte für die mit 3,5 mM Laurat inkubierten Zellen keine signifikanten Veränderungen für die TJ-abdichtenden Proteine Claudin-1, -3 oder Tricellulin im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 17), wohingegen sich das versiegelnde Claudin-5 nach 2 h Inkubation mit Laurat signalreduziert zeigte. Dieser Effekt war jedoch nach Wash-Out reversibel (Abb. 18).

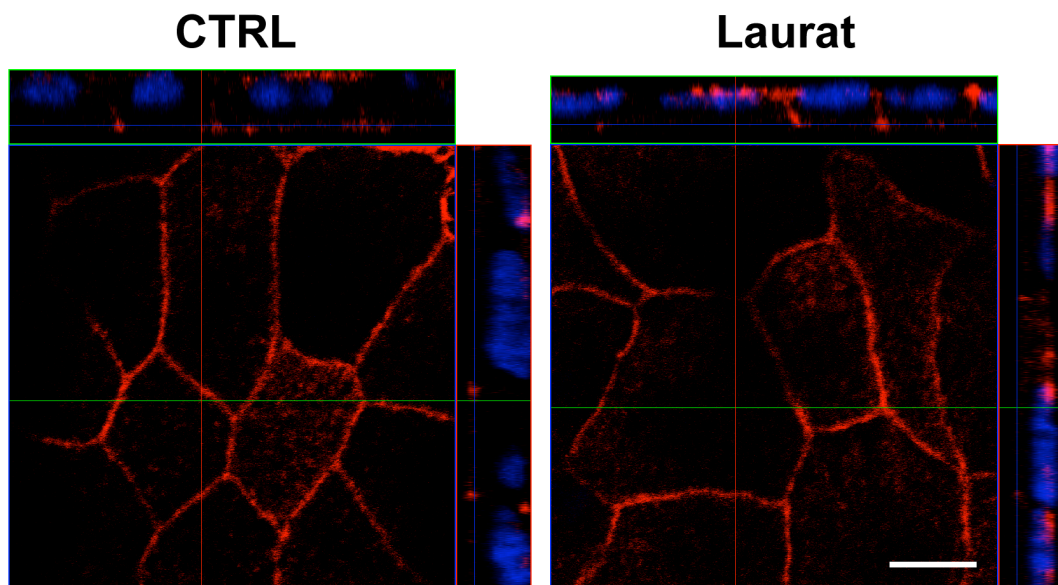


Abb. 16: Phalloidin-Färbung des Zytoskeletts. Eine immunhistochemische Färbung mit Phalloidin gab keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Zytoskeletts an den Laurateffekten. Die F-Aktin-Lokalisation nach 2 h Inkubation mit 3,5 mM Laurat blieb unverändert zu einer F-Aktin-Lokalisation in Kontrollen (n=4). Balken: 5 μ m.

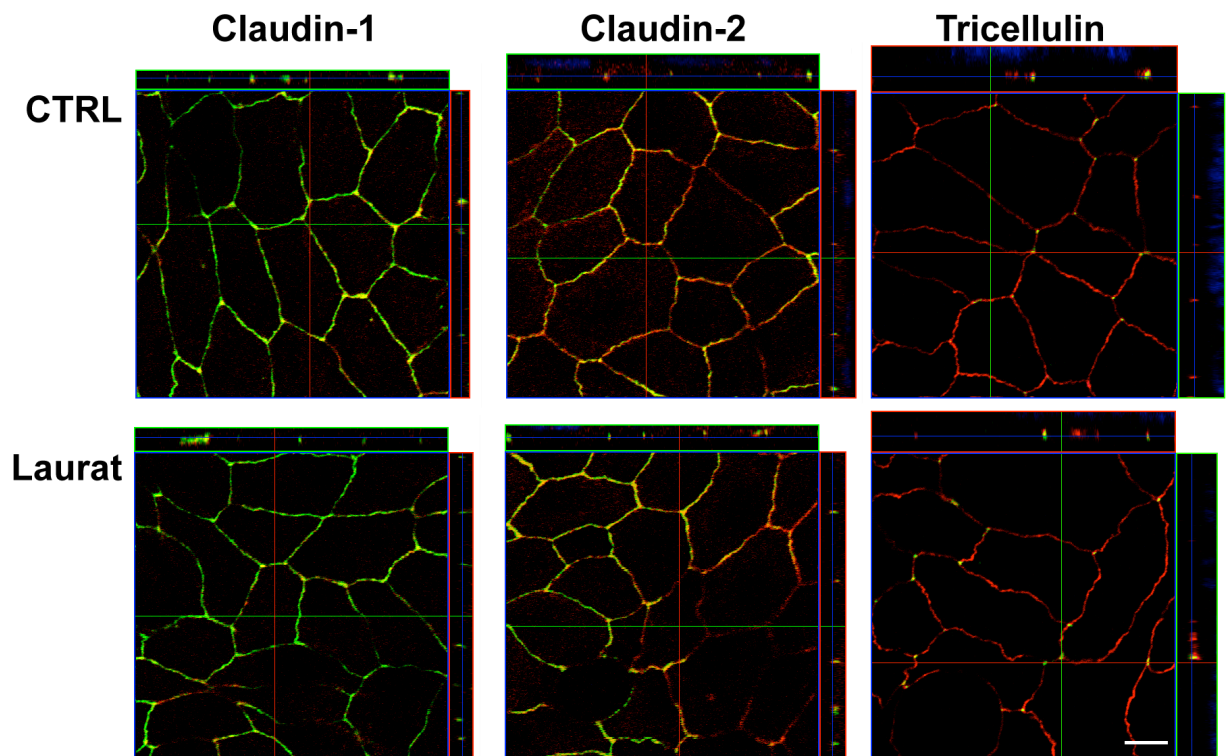


Abb. 17: Detektion von Occludin, Claudin-1, -3 und Tricellulin nach 2 h Inkubation mit Laurat. Immunhistochemische Färbungen gaben keinen Hinweis auf Veränderungen der Lokalisation von Claudin-1 und -3 (jeweils rot, Gegenfärbung von Occludin in grün), bzw. Tricellulin (grün, Gegenfärbung von Occludin in rot) nach zweistündiger Lauratexposition einer Konzentration von 3,5 mM (n=4-6).

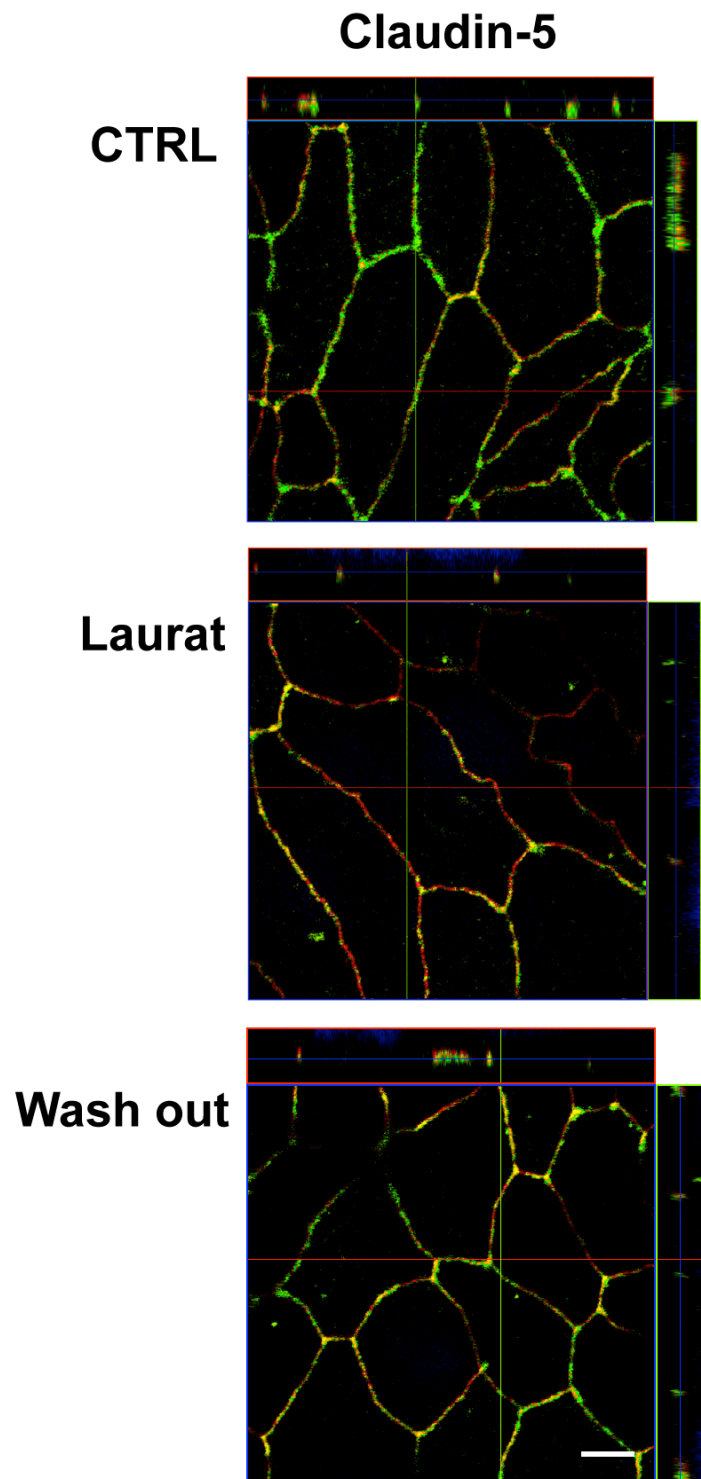


Abb. 18: Immunhistochemische Darstellung von Claudin-5 in Kontrollen, nach 2 h Inkubation mit 3,5 mM Laurat und nach anschließendem Wash-Out. Im Gegensatz zu Occludin, Claudin-1 und -3, sowie Tricellulin, bewirkte eine Exposition mit Laurat eine Signalreduktion von Claudin-5 (grün, Gegenfärbung von Occludin in rot), die nach Auswaschen reversibel war.

4.1.8 Inhibitorexperimente

Um einen Einblick in die Signalkaskade einer durch Laurat vermittelten Wirkung auf den transepithelialen Widerstand zu gewinnen, wurden verschiedene Inhibitoren einer Tight Junction-Regulation eingesetzt. Um einen inhibitorischen Effekt auf die Lauratwirkung beurteilen zu können, wurden die ermittelten Messwerte zu Werten von jeweils nur mit Laurat inkubierten Zellen in Bezug gesetzt.

Initiale Widerstandsmessungen der epithelialen Monolayer ergaben TER-Werte von $362,66 \pm 15,31 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=19).

Die Inhibitoren M18, Y-27632, Dynasore, PitStop und H7 wurden initial im Rahmen eines Pilotexperiments getestet. Dynasore, ein Inhibitor des Dynamins, das im Rahmen der Endozytose bei der Clathrin-vermittelten Vesikelbildung eine essentielle Rolle spielt, aber auch PitStop, ein direkter Inhibitor des Clathrins, sowie H7, ein nichtselektiver Inhibitor der Proteinkinase C, bewirkten im Pilotexperiment in Kombination mit Laurat einen irreversiblen Einbruch des TER, so dass sie wegen möglicher toxischer Effekte auf die Zellviabilität von weiteren Experimenten ausgeschlossen wurden.

Einen Einsatz im Rahmen weiterer Experimente fanden nur die im Labor etablierten Blocker der Aktin-Myosin-Interaktion M18 und Y-27632.

Eine Exposition mit 3,5 mM Laurat bewirkte ein Absinken des TER nach 30 min auf $77,01 \pm 8,7 \%$ des Initialwerts (n=6). M18, ein MLCK-inhibitorisches Peptid, wurde in einer Konzentration von 10^{-5} M apikal und basolateral 30 min vor Lauratapplikation hinzugegeben. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation mit 3,5 mM Laurat war der TER auf $63,61 \pm 6,42 \%$ des Initialwerts gesunken (n=4) und unterschied sich somit nicht signifikant von den jeweils nur mit Laurat inkubierten Proben.

Y-27632 wirkt als selektiver Rho-Kinase-1-Inhibitor, der u.a. in die Aktin-Myosin-Interaktion des Zytoskeletts eingreift. Y-27632 wurde in einer Konzentration von 10^{-5} M apikal und basolateral 30 min vor Lauratzugabe appliziert. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation mit Laurat kam es zu einem Abfall des TER auf $67,97 \pm 11,7 \%$ des Initialwerts, was sich nicht signifikant von den nur mit Laurat exponierten Filtern unterschied (n=4).

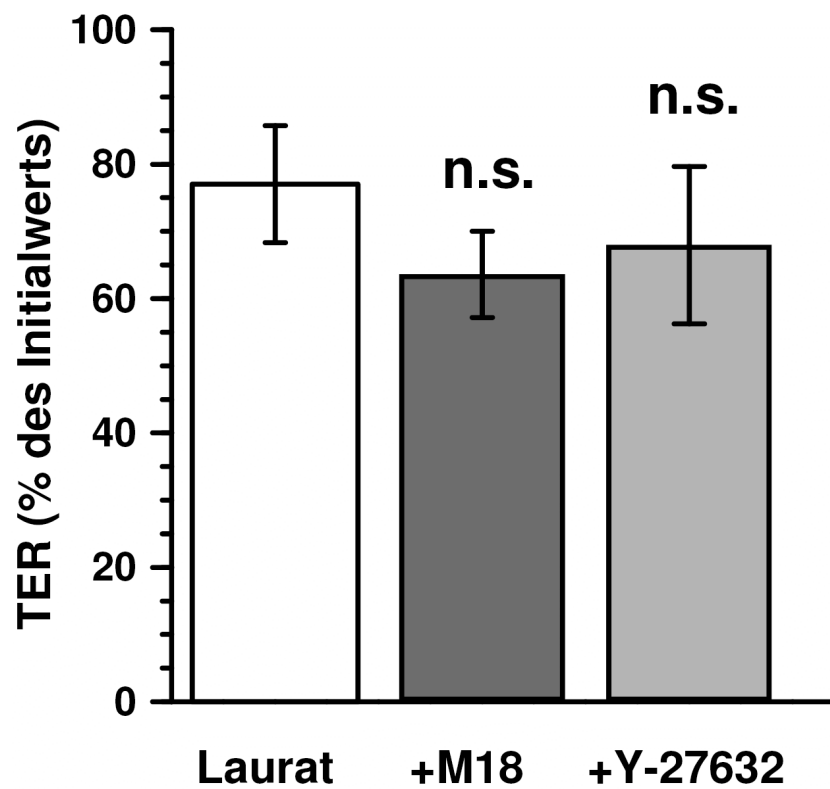


Abb. 19: Inhibitorische Wirkung auf den Laurat-vermittelten Effekt. Weder M18 noch Y-27632, Inhibitoren der Aktin-Myosin-Interaktion, konnten einen Laurateffekt verhindern. Der Abfall des TER unterschied sich unter zusätzlicher Gabe der Inhibitoren (jeweils n=4) nicht signifikant von einem rein Laurat-vermittelten Absinken des TER (n=4).

4.2 Effekte von Melittin

Zum Nachweis eines Effektes von Melittin auf die Epithelien wurden Widerstandsmessungen manuell und in Ussing-Kammern durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen der Substanzen wurden auf einen dosisabhängigen Effekt hin getestet und die Reversibilität dieser Veränderungen in Bezug zum Ausgangswert untersucht.

Messungen des initialen transepithelialen Widerstands konfluenter Monolayer zeigten Ausgangswerte von $317,4 \pm 24,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=28).

4.2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Auch für Melittin ließ sich eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit der Effekte zeigen. Kontrollen nach zweistündiger Inkubation mit Ringerlösung #111 zeigten keine signifikante Veränderung des TER ($95,66 \pm 2,08$ % des initialen Widerstands (n=10)). Die apikale Zugabe von $0,3 \mu\text{M}$ Melittin bewirkte ein Absinken des TER auf $62,75 \pm 14,17$ % des Initialwerts (n=10). Bei einer apikalen Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Melittin fiel der TER auf $19,84 \pm 0,51$ % (n=4), bei $3 \mu\text{M}$ überdies auf $12,19 \pm 0,46$ % des Initialwerts (n=4).

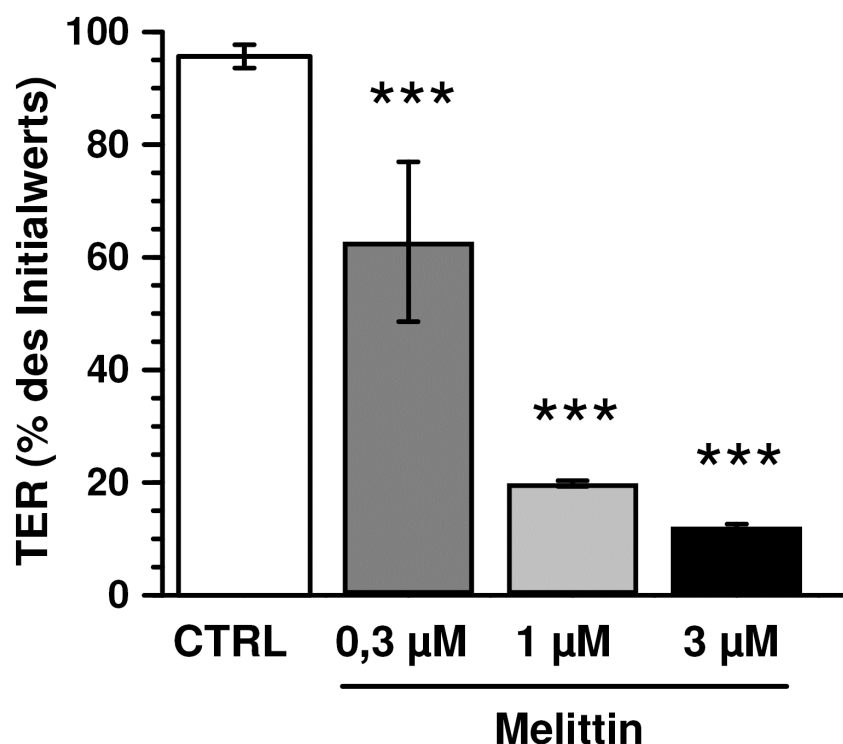


Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Melittin. Nach einer zweistündigen Inkubation mit $0,3 \mu\text{M}$ (n=10), $1 \mu\text{M}$ (n=4) und $3 \mu\text{M}$ (n=4) Melittin zeigten sich deutliche, konzentrationsabhängige Effekte auf den TER im Vergleich zu den ermittelten Initialwerten (***p < 0,001). Kontrollen (CTRL) blieben im zeitlichen Verlauf mit ihrem TER stabil (n=28).

4.2.2 Zeit-Reversibilitäts-Beziehung

Nach zweistündiger Exposition mit 0,3 μM Melittin, sowie anschließendem Auswaschen der Substanz zeigten sich deutliche zeitabhängige Effekte auf den TER.

In initialen Messungen präsentierten sich transepitheliale Widerstände von $340,8 \pm 5,93 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für Kontrollen (n=4), bzw. $297,15 \pm 13,87 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für die Melittingruppe (n=4). Kontrollen mit Ringerlösung #111 sanken mit ihrem TER auf $86,71 \pm 4,43 \%$ des Ausgangswerts nach 120 min (*p< 0,05, n=4), erholten sich aber innerhalb von 20 h auf $99,38 \pm 4,2 \%$ des Ausgangswerts (n.s., n=4).

Nach Zugabe von 0,3 μM Melittin kam es im Verlauf zu einem Absinken des TER auf $61,84 \pm 4,67 \%$ des Initialwerts nach 120 min (**p<0,01, n=4). Nach Auswaschen der Substanz zeigte sich ein Aufwärtstrend mit einer Erholung des TER auf $82,89 \pm 5,06 \%$ des Initialwerts innerhalb von 20 h (*p<0,05, n=4).

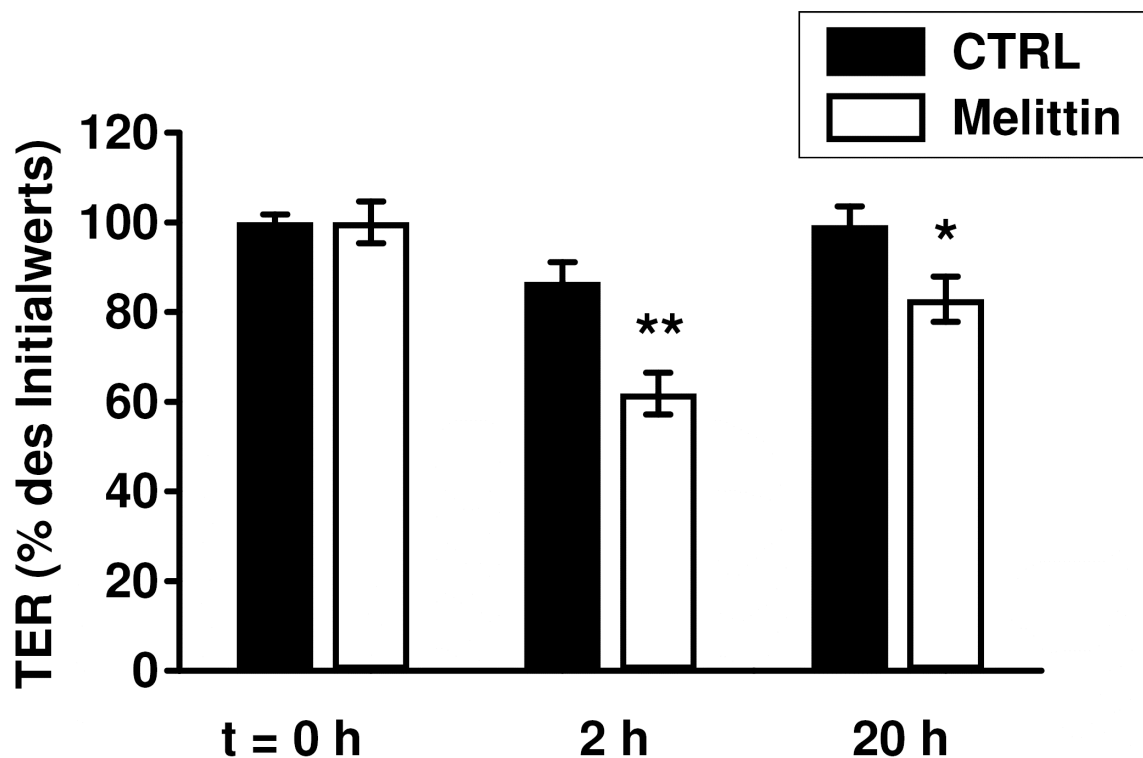


Abb. 21: Zeit-Reversibilitäts-Beziehung von Melittin. Eine zweistündige Inkubation mit 0,3 μM Melittin bewirkte im Verlauf von 120 min deutliche, zeitabhängige Effekte (**p < 0,01, n=4). Nach Auswaschen des Melittins nach 120 min erfolgte ein Wiederanstieg des TER mit einem Aufwärtstrend über 20 h. Kontrollen mit Ringerlösung #111 zeigten kein signifikantes Absinken ihres TER (n=4).

4.2.3 Zellviabilitätsmessung mittels LDH-Assay

Um toxische Effekte der eingesetzten Melittinkonzentrationen auszuschließen, wurde auch hier ein LDH-Freisetzungs-Assay durchgeführt. Der Grad der Aktivität des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Extrazellulärraum – in diesem Falle im Medium bzw. Zellüberstand – wurde als Indikator für das Ausmaß der Zellschädigung gewertet.

Eine zweistündige Exposition mit Ringerlösung #111 bewirkte in Kontrollen eine LDH-Freisetzung von $0,32 \pm 0,02$ % des totalen LDH-Gehalts ($n=4$).

Eine Inkubation mit verschiedenen Melittinkonzentrationen ergab eine LDH-Freisetzung von $1,02 \pm 0,32$ % unter Gabe von $0,3 \mu\text{M}$ Melittin, $11,8 \pm 2,26$ % unter Gabe von $1 \mu\text{M}$ Melittin und $19,0 \pm 3,73$ % unter Gabe von $3 \mu\text{M}$ Melittin.

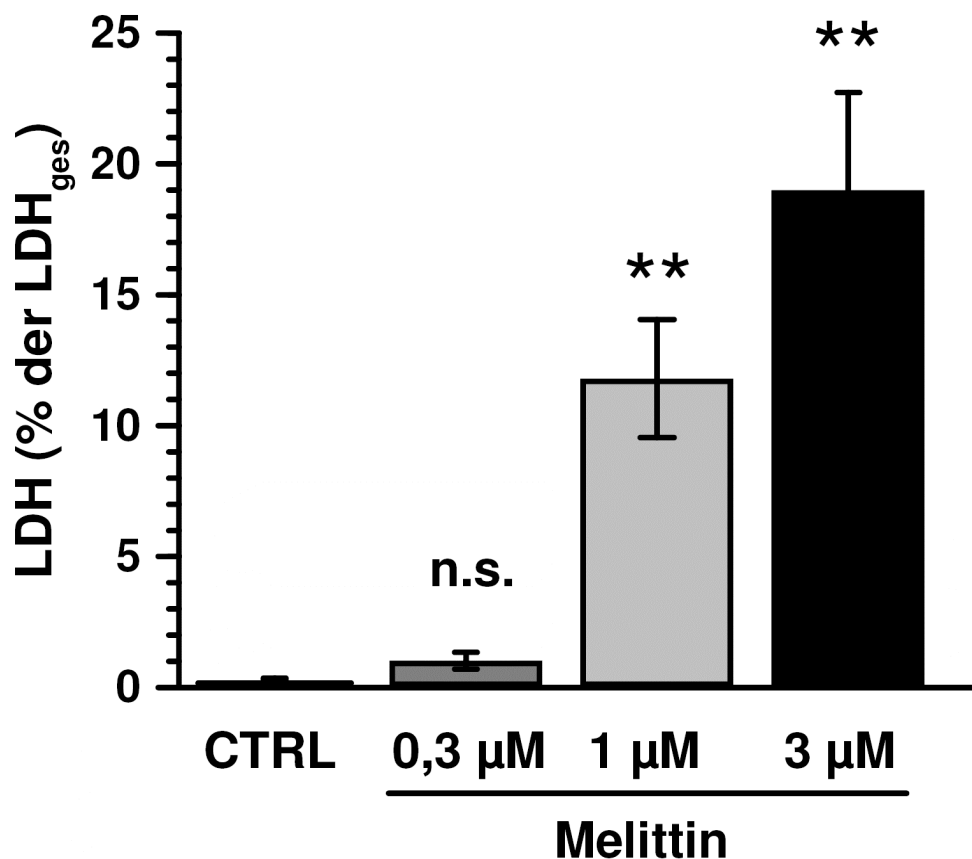


Abb. 22: LDH-Assay für Melittin. Die zweistündige Exposition der epithelialen Monolayer mit $0,3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $3 \mu\text{M}$ Melittin bewirkte konzentrationsabhängige Unterschiede in der jeweiligen Freisetzung des zytosolischen Enzyms LDH in Prozent des Gesamt-LDH-Gehalts (n.s., ** $p < 0,01$, jeweils $n=4$). Eine geringere Freisetzung von LDH wurde als Zeichen einer physiologischen Verträglichkeit der applizierten Konzentration interpretiert.

4.2.4 Zwei-Wege-Impedanzmessung

Zur Unterscheidung zwischen transzellulärem und parazellulärem Anteil des epithelialen Widerstands wurde eine Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie bei einer Konzentration von 0,3 μM Melittin durchgeführt (Abb. 23). Kontrollen mit Ringerlösung #111 waren durchgehend im epithelialen Widerstand R^{epi} mit $463,9 \pm 19,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ stabil und zeigten einen transzellulären Widerstand R^{trans} von $658,0 \pm 40,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$, sowie einen parazellulären Widerstand R^{para} von $1636,7 \pm 145,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=5$). Nach Applikation von 0,3 μM Melittin kam es zu einer Abnahme des epithelialen Widerstands R^{epi} auf $254,14 \pm 68,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (* $p < 0,05$, $n=6$). Dabei sank der parazelluläre Widerstand R^{para} deutlich ab auf $404,44 \pm 126,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (*** $p < 0,001$). Der transzelluläre Widerstand R^{trans} blieb hingegen mit $719,96 \pm 143,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf Kontrollniveau. Diese Ergebnisse deuten auf einen rein parazellulären Effekt von Melittin hin.

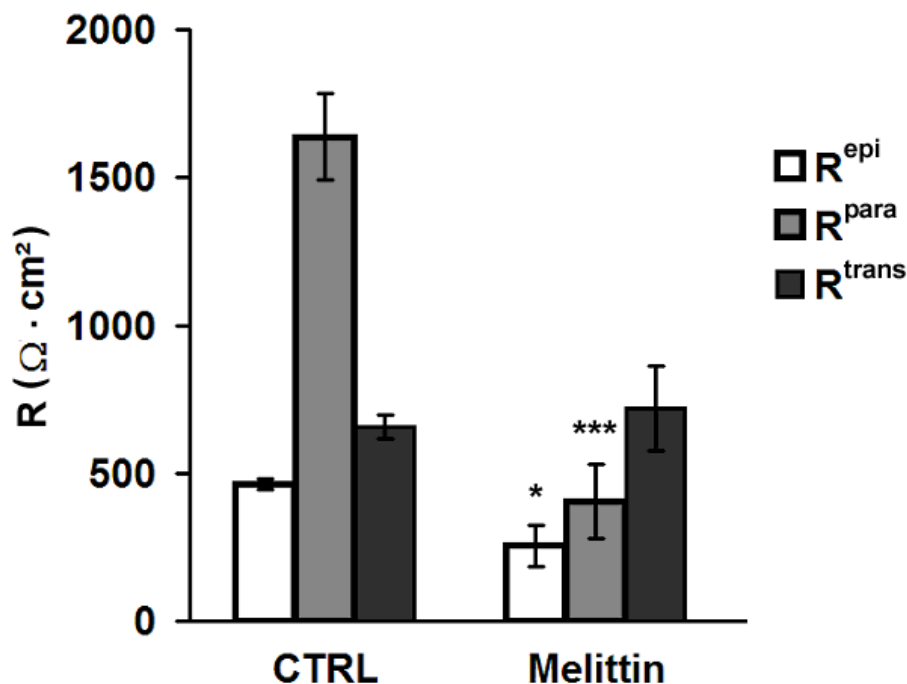


Abb. 23: Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie für Melittin. Melittin senkte den epithelialen Widerstand R^{epi} (* $p < 0,05$) über einen Effekt auf den parazellulären Widerstand R^{para} (*** $p < 0,001$). Im Gegensatz hierzu blieb der transzelluläre Widerstand R^{trans} unverändert, was auf einen exklusiven Effekt der Substanzen auf die parazellulären Barriereigenschaften hinweist. In Kontrollen mit Ringerlösung #111 zeigte sich der epitheliale Widerstand konstant.

4.2.5 Markerflux-Experimente

Um die Größenselektivität des parazellulären Weges nach Zugabe von 0,3 μM Melittin zu beurteilen, wurden die Permeabilitäten von Fluorescein (330 Da) und FITC-Dextran (4 kDa) in unidirektionalen Flux-Experimenten analysiert.

In der mit 0,3 μ M Melittin inkubierten Gruppe nahm die Permeabilität für Fluorescein nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe zu (Abb. 24A) mit $0,082 \pm 0,008 \cdot 10^{-6}$ cm/s und $0,081 \pm 0,009$, (n=7 und 4). Für FITC-Dextran (4 kDa) zeigte sich ebenfalls keine signifikant erhöhte Permeabilität (Abb. 24B). Kontrollen wiesen eine Permeabilität für FITC-Dextran (4 kDa) von $0,094 \pm 0,0062 \cdot 10^{-6}$ cm/s (n=4) auf. Die mit Melittin inkubierten Proben zeigten eine Permeabilität für FITC-Dextran (4 kDa) von $0,103 \pm 0,0053 \cdot 10^{-6}$ cm/s (n=4). Von einem Permeationstest mit Sulpho-NHS-SS-Biotin (606,7 Da) wurde in Hinblick auf die nicht signifikante Zunahme der Permeabilität von Fluorescein (330 Da) abgesehen.

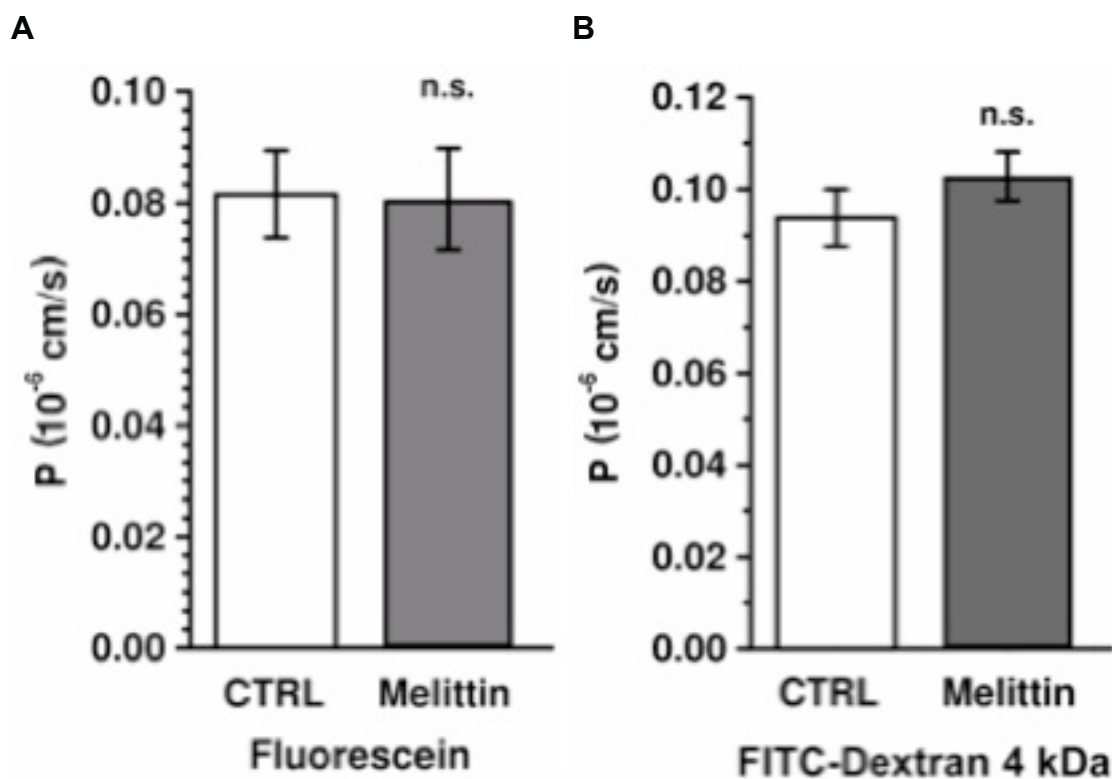


Abb. 24: Marker-Permeabilitäten für Melittin. Die apikale Zugabe von 0,3 μ M Melittin erhöhte die Permeabilitäten von Fluorescein und FITC-Dextran (4 kDa) nicht signifikant.

4.2.6 Western Blots

Zum Nachweis eines Effektes von 0,3 μ M Melittin auf die TJ-Proteine wurden Western Blot-Analysen von Gesamtprotein- und Membranproteinpräparationen konfluenten Zellmonolayer nach zweistündiger Inkubation erstellt (n=4). Kontrollen wurden über zwei Stunden mit Ringerlösung #111 inkubiert (n=4).

Weder im Gesamtlisat noch in der Membranfraktion zeigten sich deutliche Veränderungen in den TJ-Proteinen Claudin-1, -2, -3, -4, -5, Occludin und Tricellulin verglichen mit den β -Aktin-Signalen der jeweiligen Präparationen (Abb. 25).

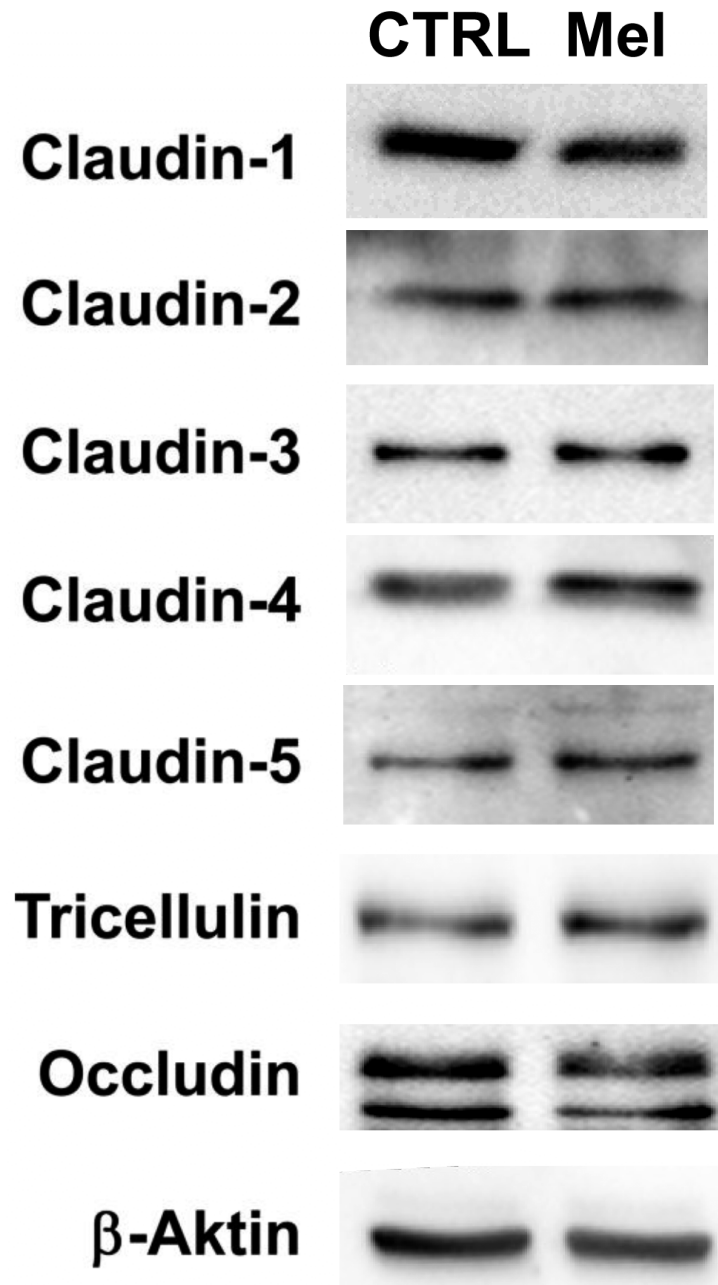
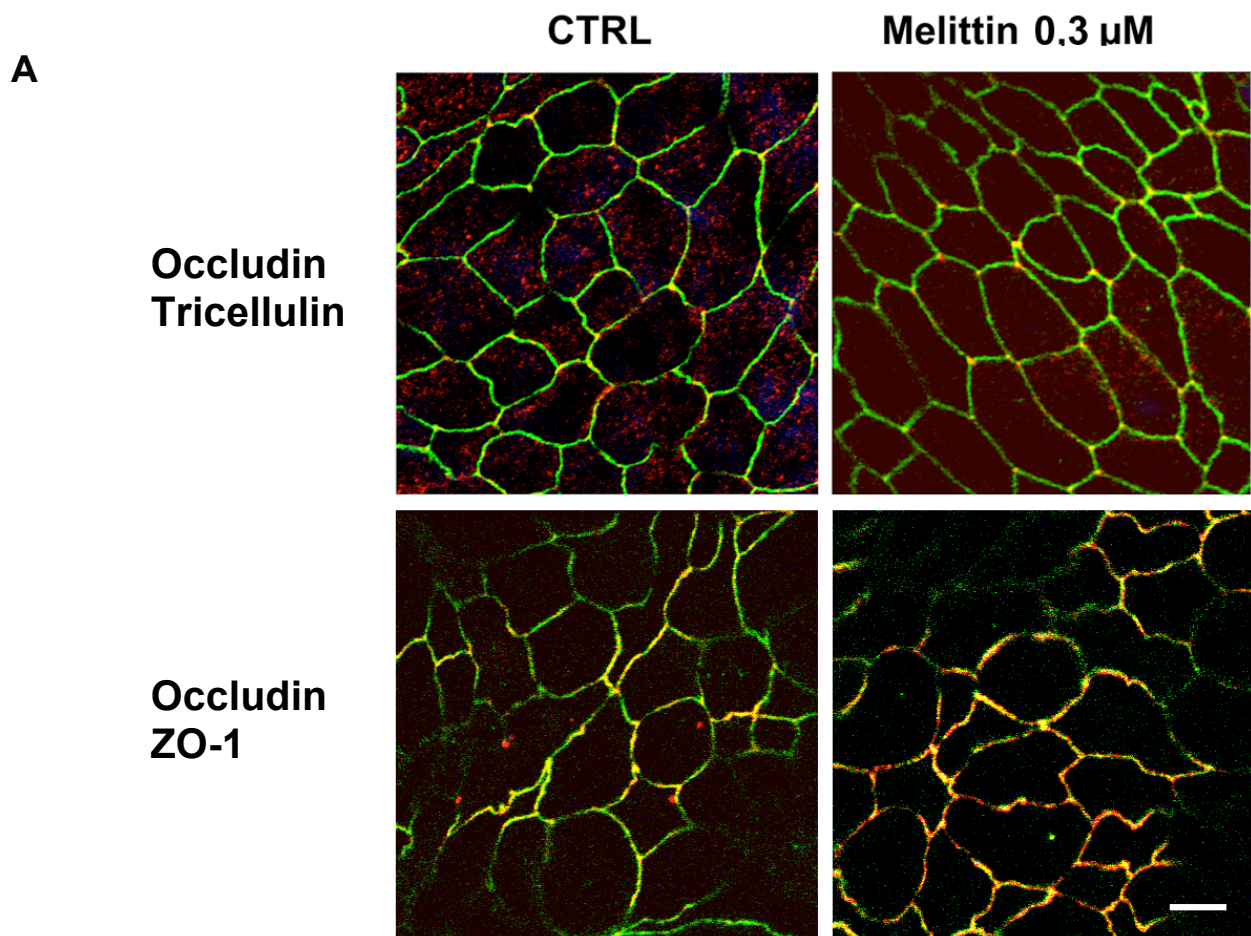


Abb. 25: Effekte von 0,3 μ M Melittin auf die Proteine der Tight Junction in Western Blots. Gesamtlisat- und Membranfraktionproteinpräparationen zeigten in der Western Blot-Analyse keine deutlichen Veränderungen der TJ-Proteine nach Inkubation mit 0,3 μ M Melittin (n=4). In beiden Ansätzen variierte die Sensitivität der Detektion einzelner Proteine, was somit nicht als Indikation eines quantitativen Unterschieds zwischen den beiden Präparationsprotokollen gewertet wurde.

4.2.7 Immunfluoreszenz

Nach 30-minütiger bzw. zweistündiger Inkubation mit 0,3 μM Melittin wurden die Proteine Occludin, Tricellulin, verschiedene Claudine, ZO-1, sowie das Aktin-Myosin-Zytoskelett und die Zell-Nuklei in immunhistochemischen Färbungen der TJ-Proteine dargestellt (n=4). Kontrollen wurden mit Ringerlösung #111 inkubiert (n=4). Sowohl in bi- als auch trizellulären Tight Junctions konnte eine Ko-Lokalisation der TJ-Proteine mit Occludin bzw. ZO-1 nachgewiesen werden, wohingegen Tricellulin sich vor allem in trizellulären Zellkontakten darstellen ließ. Für die mit 0,3 μM Melittin inkubierten Zellen zeigte die immunfluoreszenz-mikroskopische Analyse der Färbungen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen (Auswahl, Abb. 26A).

Bei einer höheren Konzentration von 1 μM Melittin ließ sich jedoch eine deutliche Veränderung in der Struktur der Zellkontakte feststellen, die sich in Form einer perlschnurartigen Vesikelbildung entlang der Zellmembran darstellte. In Kontrollen zeigte sich im Gegensatz dazu ein homogenes, regelmäßiges Erscheinungsbild der Zellkontakte (Abb. 26B).



B

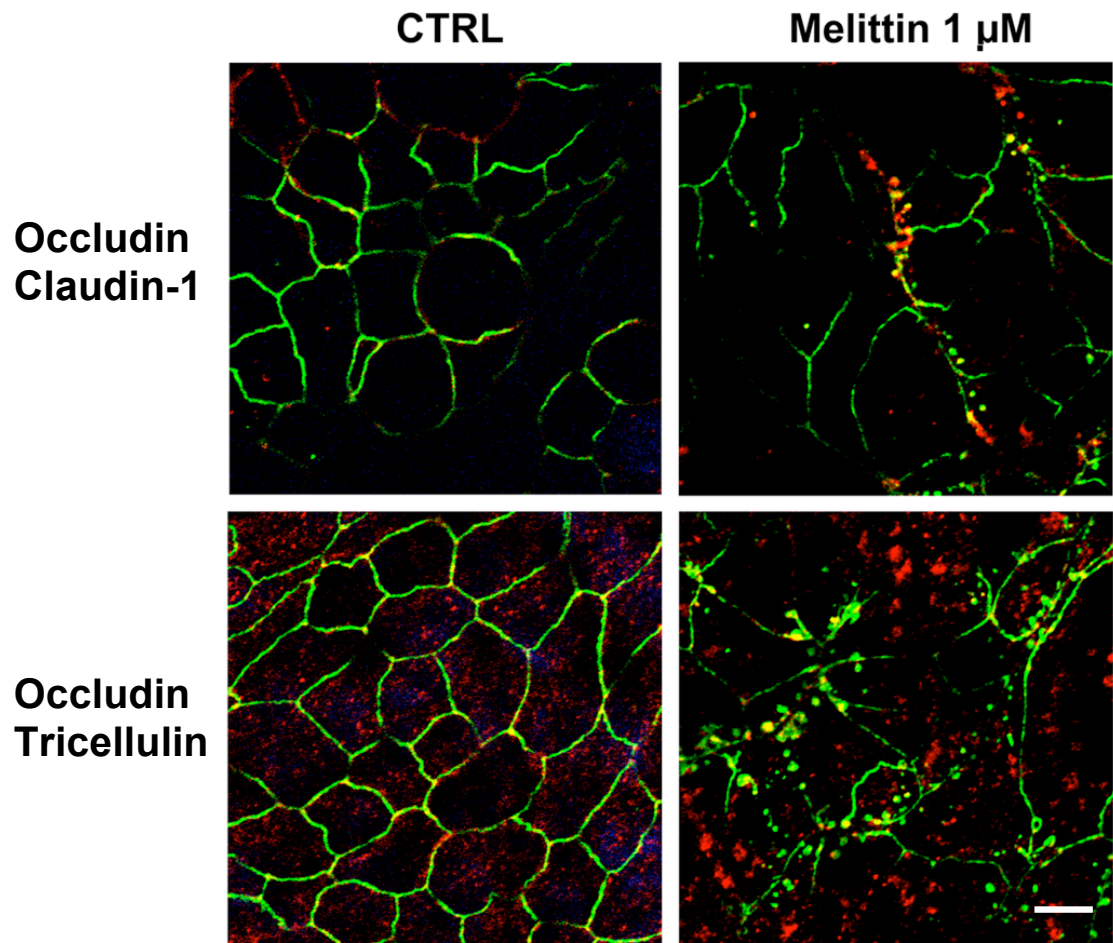


Abb. 26: Immunhistochemische Darstellung von Occludin, Claudin-1 und Tricellulin nach Inkubation mit 0,3 μ M (A) bzw. 1 μ M (B) Melittin und in Kontrollen. Unter 0,3 μ M Melittin zeigten sich keine Veränderungen in der immunhistochemischen Darstellung im Vergleich zu Kontrollen (A). Bei der höheren Konzentration von 1 μ M Melittin ließ sich jedoch eine deutliche Veränderung in der Struktur der Zellkontakte feststellen, die sich in Form einer perlschnurartigen Vesikelbildung entlang der Zellmembran darstellte (B). In Kontrollen zeigte sich im Gegensatz dazu ein homogenes, regelmäßiges Erscheinungsbild der Zellkontakte. Balken: 5 μ M.

4.2.8 Inhibitorexperimente

Um einen Melittin-vermittelten Effekt auf den transepithelialen Widerstand zu inhibieren und somit einen Einblick in die Signalkaskade zu gewinnen, wurden verschiedene Blocker einer Tight Junction-Regulation eingesetzt. Zur Beurteilung des inhibitorischen Effekts wurden die ermittelten Messwerte zu Werten von jeweils nur mit Melittin inkubierten Zellen in Bezug gesetzt.

Initiale Widerstandsmessungen der epithelialen Monolayer ergaben TER-Werte von $362,66 \pm 15,31 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=19).

Die Inhibitoren M18, Y-27632, Dynasore, PitStop und H7 wurden, wie bereits für Laurat beschrieben, initial im Rahmen eines Pilotexperiments getestet. Dynasore, PitStop sowie H7, bewirkten auch in Kombination mit Melittin im Pilotexperiment einen nicht-reversiblen Einbruch des TER, so dass ihr Ausschluss aus weiteren Experimenten wegen möglicher toxischer Effekte auf die Zellviabilität erfolgte.

Einen Einsatz im Rahmen weiterer Experimente fanden auch hier nur die im Labor etablierten Blocker der Aktin-Myosin-Interaktion M18 und Y-27632.

Eine Exposition mit 0,3 μM Melittin verursachte einen Abfall des TER nach 30 min auf $54,74 \pm 6,63$ % des Initialwerts ($n=5$). 30 min vor Melittinapplikation wurde M18, ein MLCK-inhibitorisches Peptid, in einer Konzentration von 10^{-5} M apikal und basolateral hinzugegeben. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation mit 0,3 μM Melittin war der TER auf $64,67 \pm 12,46$ % des Initialwerts gesunken ($n=3$) und unterschied sich somit nicht signifikant von den jeweils nur mit Melittin inkubierten Proben.

Y-27632 wurde in einer Konzentration von 10^{-5} M apikal und basolateral 30 min vor Melittinzugabe appliziert. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation mit Melittin kam es zu einem Abfall des TER auf $71,57 \pm 8,3$ % des Initialwerts ($n=4$), was sich somit nicht signifikant von den nur mit Melittin ohne Inhibitor inkubierten Filtern unterschied.

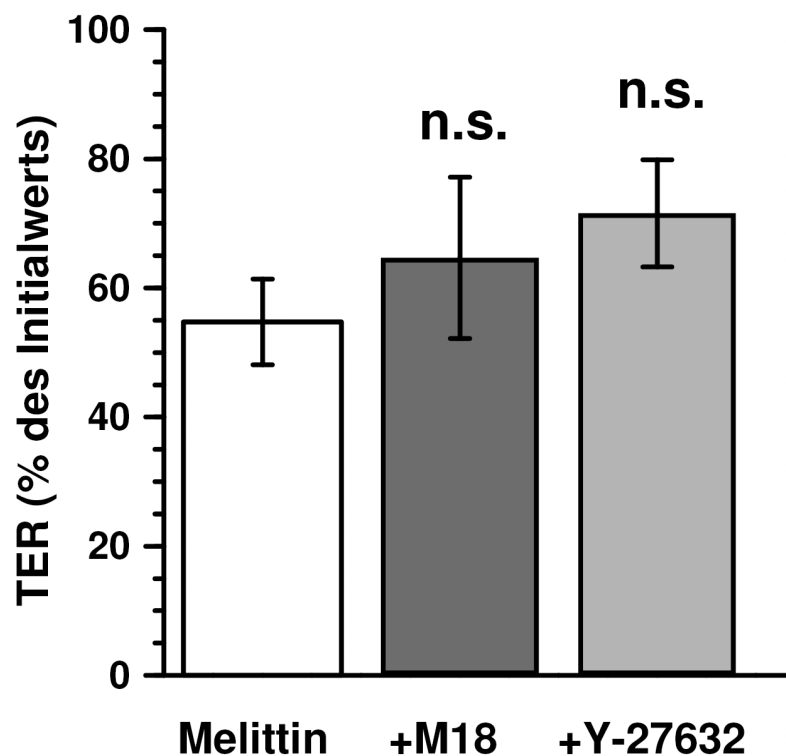


Abb. 27: Inhibitorische Effekte auf die Wirkung von Melittin. Die Inhibitoren der Aktin-Myosin-Interaktion M18 und Y-27632 konnten den Melittin-vermittelten Effekt auf den TER nicht signifikant verhindern.

5 Diskussion

5.1 Analyse von Laurat- und Melittineffekten in HT-29/B6-Epithelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte von Laurat und Melittin auf intestinale Epithelien untersucht und die Eignung der jeweiligen Substanz als potentieller Absorptionenhancer einer oralen Arzneimittellapplikation *in vitro* evaluiert.

Als intestinales Epithelzellmodell diente die Zelllinie HT-29/B6, die sich besonders gut für die Analyse von Barriereeigenschaften humaner Kolonepithelien eignet (Kreusel et al., 1991), u.a. bedingt durch die endogene Expression wichtiger barrierebildender TJ-Tetraspan-Proteine, darunter Occludin, Tricellulin (Krug et al., 2009a) und die Claudine (Amasheh et al., 2005; Amasheh et al., 2009b; Amasheh et al., 2010). Parallele Studien an humanen HT-29/B6-Zellen und Intestinalepithelien von Nagetieren zeigten zudem eine hohe Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Amasheh et al., 2009b; Amasheh et al., 2010; Amasheh et al., 2012). Bereits in vorangegangenen Studien, in deren Rahmen das Polysaccharid Chitosan (Rosenthal et al., 2012) und die mittelkettige Fettsäure Caprat (Krug et al., 2013) auf ihre Eignung als Absorptionenhancer hin geprüft wurden, erwies sich die Zelllinie HT-29/B6 als zuverlässiges *in vitro* - Zellmodell.

5.2 Laurateffekte

5.2.1 Zellviabilität und elektrophysiologische Effekte von Laurat

Laurat ist eine mittelkettige Fettsäure mit natürlichem Vorkommen in diversen pflanzlichen Ölen und tierischen Fetten (Mortimer & Müller, 2010). Zusätzlich hat Laurat einen hohen Anteil an den Fettsäuren der Triglyceride humaner Milch (Francois et al., 1998). Die Konzentration von Laurat in der Muttermilch variiert zwar sowohl in Abhängigkeit vom Lauratgehalt der Nahrung der Stillenden (Francois et al., 1998), als auch in Abhängigkeit vom Zeitpunkt innerhalb der Stillperiode¹³ (Moltó-Puigmartí et al., 2011), liegt jedoch im Mittel bei 4,7 % des totalen Fettgehalts humaner Milch¹⁴ und ist somit deutlich höher konzentriert als beispielsweise Caprat mit einem Anteil von nur 0,9 % (Francois et al., 1998).

¹³ Moltó-Puigmartí et al. unterscheiden zwischen Kolostrum, transitorischer und reifer Milch (Moltó-Puigmartí et al., 2011).

¹⁴ Der in höheren Dosen permeabilisierende Effekt auf die intestinale Barriere könnte möglicherweise eine Funktion im Rahmen absorptiver Prozesse des Neugeborenen haben.

Das Vorkommen als natürliche Komponente der menschlichen Nahrung spricht also für eine potentiell harmlose orale Applikation im Rahmen eines Absorptionenhancements. Zytotoxische Effekte der experimentell verwendeten Konzentration von 3,5 mM Laurat auf das *in vitro* - Zellmodell HT-29/B6 konnten im LDH-Freisetzungs-Assay ausgeschlossen werden.

Laurat zeigte im Experiment eine zeit- und dosisabhängige Wirkung auf den transepithelialen Widerstand konfluenten, epithelialer Monolayer. 3,5 mM Laurat bewirkten dabei ein deutliches Absinken des TER im Vergleich zu Kontrollen mit anschließender Erholung des transepithelialen Widerstands nach Auswaschen der Substanz. Diese Ergebnisse wurden als Hinweis für die Reversibilität der Lauratwirkung gewertet, die im Einklang mit der Nicht-Toxizität von 3,5 mM Laurat in HT-29/B6-Zellen steht.

Eine 2PI-spektroskopische Analyse ergab darüberhinaus ein Absinken von R^{epi} durch einen isolierten Abfall von R^{para} , sodass von einer rein parazellulär vermittelten Wirkung des Laurats auf den transepithelialen Widerstand ausgegangen werden kann. Dies entspricht Ergebnissen der mittelkettigen Fettsäure Caprat, die ebenfalls rein parazellulär in HT-29/B6-Zellen wirkt (Krug et al., 2013). Weder für Laurat noch für Caprat zeigten sich simultane signifikante Veränderungen des transzellulären Widerstands (Krug et al., 2013). Chitosan, ein Chitinderivat, bewirkte im Gegensatz hierzu ein Absinken des TER in HT-29/B6-Zellen nicht nur über eine Verringerung des para-, sondern auch des transzellulären Widerstands R^{trans} (Rosenthal et al., 2012).

Die für Laurat gezeigte parazelluläre Wirkung wurde als Hinweis einer Veränderung der TJ gedeutet, die maßgeblich den parazellulären Widerstand und die parazellulären Barriereigenschaften bestimmt. Eine damit einhergehende deutlich erhöhte Permeabilität für den niedermolekularen Permeabilitätsmarker Fluorescein (330 Da) konnte zwar in Fluxexperimenten nachgewiesen werden, für Biotin (600 Da) und das erheblich größere Markermolekül FITC-Dextran (4 kDa) ließ sich dieser Effekt jedoch nicht zeigen.

Dies deutet darauf hin, dass Laurat in HT-29/B6-Zellen zwar einen spezifischen Effekt auf die parazelluläre Ionendurchlässigkeit hat, nicht aber auf die parazelluläre Permeabilität größerer Moleküle.

Dass sowohl Caprat (Krug et al., 2013) als auch Chitosan (Rosenthal et al., 2012) bei vergleichbarem Effekt auf den TER die Permeabilität von FITC-Dextranen bis zu einem Molekulargewicht von 10 kDa erhöhen, zeigt zudem, dass sich eine Veränderung des transepithelialen Widerstands in HT-29/B6-Zellen nicht direkt mit dem Ausmaß der parazellulären Permeabilität bzw. deren Größenselektivität korrelieren lässt.

Ein komplexer Zusammenhang von TER und Permeabilität hatte sich diesbezüglich bereits in Studien an Caco-2-Zellen angedeutet (Lindmark et al., 1998). Im Rahmen von Inhibitorexperimenten ließ sich zwar die Wirkung von Laurat auf den TER attenuieren, die Permeabilität der Markermoleküle Fluorescein und [^{14}C]-Mannitol blieb jedoch uneingeschränkt erhöht (Lindmark et al., 1998).

Um einen Signalweg für die durch Laurat vermittelten Effekte einzugrenzen, wurden verschiedene Inhibitoren der TJ-Regulation und Aktin-Myosin-Interaktion eingesetzt. Die Blocker Dynasore, PitStop und H7 erwiesen sich dabei jedoch als potentiell zytotoxisch, da sie in Kombination mit Laurat zu irreversiblen Einbrüchen des TER führten und die hierbei erzielten Ergebnisse nicht für eine statistische Analyse geeignet waren.

Auch M18 und Y-27632, in unserem Labor etablierte Blockersubstanzen, die bereits in HT-29/B6-Zellen erfolgreich eingesetzt wurden und die unabhängig vom vorausgegangenen Signalweg die Aktin-Myosin-Interaktion inhibieren, konnten den Laurateffekt nicht signifikant attenuieren. Somit ließen sich die Ergebnisse aus Caco-2-Zellen (Lindmark et al., 1998), die u.a. eine Phospholipase-C-vermittelte Signaltransduktion postulierten, nicht in unserem Zellmodell reproduzieren.

5.2.2 Spezifische Effekte von Laurat auf die parazelluläre Barriere

Die Western Blot-Analyse von Membranproteinen und Gesamtlisat zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Laurat-inkubierten Proben und Kontrollen.

In immunhistochemischen Färbungen zeigten sich keine Veränderungen in der Lokalisation der TJ-Proteine Occludin, Claudin-1 und -3 und Tricellulin, und auch TJ-assoziierte Proteine wie ZO-1 blieben in ihrer Lokalisation unverändert, wie auch ein Laurat-vermittelter Effekt auf das Aktin-Zytoskelett nicht beobachtet wurde, was in Einklang mit den Ergebnissen der Inhibitorexperimente steht. Es konnte jedoch eine reversible Signalreduktion von Claudin-5 mit einem Laurateffekt korreliert werden, die nach Wash-Out der Substanz auf die Ausgangssignalstärke zurückkehrte. Eine isolierte Veränderung in der Distribution von Claudin-5, das als wichtige Determinante der parazellulären Barriere die Passage von Ionen und kleineren Molekülen wie [^3H]-Mannitol verhindert (Amasheh et al., 2005), steht somit im Einklang mit den Erkenntnissen der Permeabilitätsexperimente, in denen ein erhöhter Flux von Fluorescein (330 Da), nicht aber von FITC-Dextran (4 kDa) beobachtet werden konnte. Durch eine Untersuchung der Permeabilität von Sulpho-NHS-SS-Biotin (606,7 Da) konnte die Größenselektivität der parazellulären Passage weiter eingegrenzt werden. Hierbei konnte keine signifikan-

te Penetration des Sulpho-NHS-SS-Biotins nach inner- oder unterhalb der TJs detektiert werden, so dass für die Laurat-induzierte Größenselektivität der parazellulären Permeabilität ein Größenbereich um 330 Da mit einem Cut-Off bei 600 Da angenommen werden kann. Auch die Fettsäure Caprat (C10), die in ihren Eigenschaften dem Laurat (C12) nicht unähnlich ist, führt zu einer Reduktion in der Claudin-5-Distribution mit einer erhöhten Permeabilität für Fluorescein (Krug et al., 2009b; Del Vecchio et al., 2012). Zusätzlich reduziert Caprat jedoch auch das TJ-Protein Tricellulin, das als wichtiges Element trizellulärer TJs die Passage von Makromolekülen verhindert (Krug et al., 2009a), was sich unter Capratwirkung in einem erhöhten Flux für FITC-Dextrane bis zu einer Größe von 10 kDa widerspiegelt. Eine mögliche Erklärung hierfür findet sich eventuell in den chemischen Eigenschaften der Fettsäuren Laurat und Caprat. Caprat, die kleinere der beiden Substanzen, könnte aufgrund einer effizienteren Akzessibilität leichter an seine Zielstruktur, dem Tricellulin trizellulärer TJs, vordringen, während Laurat aufgrund seiner Größe dieser erleichterte Zugang verwehrt bliebe.

Während der genaue Wirkmechanismus auf das Claudin-5 noch ungeklärt ist, konnte in verschiedenen inhibitorischen Experimenten zumindest eine Beteiligung des Zytoskeletts, aber auch verschiedener Kinasen ausgeschlossen werden (siehe 5.2.1.). Aufgrund der Geschwindigkeit des Effekteintritts des Laurats wird jedoch eine direkte Interaktion mit Claudin-5-tragenden Mikrodomänen der Zellmembran nicht ausgeschlossen.

5.3 Melittineffekte

5.3.1 Zellviabilität und elektrophysiologische Effekte von Melittin

Das xenobiotische Peptid Melittin ist kein natürlicher Bestandteil der menschlichen Nahrung und wirkt in hohen Konzentrationen zytotoxisch (Pratt et al., 2005). Für die im Experiment verwendete Konzentration von 0,3 μM Melittin ließ sich in den HT-29/B6-Zellen jedoch kein Hinweis auf Zytotoxizität feststellen, so dass eine Verwendung von Melittin als deutlich harmloser eingestuft wurde als beispielsweise die Applikation einiger weitaus häufiger konsumierter Substanzen wie Aspirin oder Ethanol (Bjarnason, 1994; Wolffe et al., 1999).

Auch für Melittin ließ sich im Experiment eine zeit- und dosisabhängige Wirkung auf den transepithelialen Widerstand konfluenter, epithelialer Monolayer nachweisen. Verglichen mit Kontrollen bewirkten 0,3 μM Melittin ein deutliches Absinken des TER und einen anschließenden Wiederanstieg des transepithelialen Widerstands nach Auswa-

schen der Substanz. Dieser Hinweis auf eine Reversibilität des Melittineffekts steht in Übereinstimmung mit der Nicht-Toxizität von 0,3 μM in HT-29/B6-Zellen.

In einer 2PI-spektroskopischen Analyse zeigte sich zudem, ähnlich wie für Laurat, ein Absinken von R^{epi} durch einen isolierten Abfall von R^{para} ohne Auswirkung auf den transzellulären Widerstand R^{trans} . Dies spricht für eine rein parazelluläre Wirkung des Melittins auf den transepithelialen Widerstand und wurde, ebenfalls wie bei Laurat, als Hinweis für eine Veränderung an der TJ gedeutet, die den parazellulären Widerstand und die parazellulären Barriereigenschaften bestimmt. Eine erhöhte Permeabilität, die in Fluxexperimenten für die Permeabilitätsmarker Fluorescein (330 Da) und FITC-Dextran (4 kDa) untersucht wurde, ließ sich jedoch nicht zeigen.

Um die Signaltransduktion der Melittin-vermittelten Effekte genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Inhibitoren der TJ-Regulation und Aktin-Myosin-Interaktion eingesetzt. Dynasore, PitStop und H7 erwiesen sich dabei, ebenso wie für Laurat, als potentiell zytotoxische Kombinationspartner, da sie irreversible Einbrüche des TER verursachten. Die somit erzielten Ergebnisse wurden nicht für eine statistische Analyse ausgewertet.

Auch für Melittin zeigten M18 und Y-27632, etablierte Inhibitoren der Aktin-Myosin-Interaktion, keinen Effekt auf eine Melittinwirkung. Die Ergebnisse aus Caco-2-Zellen (Maher et al., 2005), die einen Prostaglandin-vermittelten Signalweg als Regulation der TJ postulierten, konnten auch hier nicht in unserem Zellmodell reproduziert werden.

5.3.2 Spezifische Effekte von Melittin auf die parazelluläre Barriere

Hauptdeterminante für die parazelluläre Permeabilität ist, wie oben bereits beschrieben, die Tight Junction. Wichtige Tetraspan-Proteine wie Occludin (Furuse et al., 1993), die Claudine (Furuse et al., 1998) und Tricellulin (Ikenouchi et al., 2005) sind an ihrem Aufbau beteiligt. Eine Kommunikation mit dem Zytoskelett erfolgt mittels Scaffolding-Proteinen wie ZO-1 (Yeaman et al., 1999; González-Mariscal et al., 2003).

Zwischen Melittin-exponierten Proben und Kontrollen zeigten sich in der Western Blot-Analyse von Membranproteinen und Gesamtlisat jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Auch in immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigten sich bei einer Konzentration von 0,3 μM keine signifikanten Veränderungen. Erst bei einer höheren Konzentration von 1 μM zeigten sich eindeutige Veränderungen in der Lokalisation der TJ-Proteine. Dabei imponierten perlschnurartige Veränderungen entlang der Zellmem-

branen, die am ehesten als Vesikelabschnürungen gewertet wurden. TJ-assoziierte Proteine wie ZO-1 blieben jedoch in ihrer Lokalisation unverändert. Auch ein Effekt auf das Aktin-Zytoskelett unter Zugabe von Melittin blieb aus, was wiederum in Einklang mit den Ergebnissen der Inhibitorexperimente steht.

5.4 Beurteilung der Ergebnisse

Sowohl 3,5 mM Laurat als auch 0,3 μ M Melittin sind in der Lage, den parazellulären Widerstand in HT-29/B6-Zellen schnell, selektiv und reversibel zu senken. Nicht-Toxizität, ein Hauptkriterium in der Entwicklung eines Absorptionenhancers (siehe 1.3.), konnte für beide Substanzen in diesen Konzentrationen nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse für Laurat und Melittin wurden bereits in Caco-2-Zellen beschrieben (Lindmark et al., 1998; Maher et al., 2005). Auch eine Verbesserung der Permeabilität für Fluorescein und [14 C]-Mannitol im Falle von Laurat (Lindmark et al., 1998) bzw. Fluorescein und verschiedener FITC-Dextrane (3,10 und 70 kDa) im Falle von Melittin (Maher et al., 2005) wurde beschrieben.

Während sich im Einklang mit diesen Beobachtungen in unserem Zellmodell für 3,5 mM Laurat zwar eine erhöhte Permeabilität für Fluorescein bestätigte, konnte keine Verbesserung der Permeabilität von größeren Molekülen wie FITC-Dextran (4 kDa) nachgewiesen werden. Für 0,3 μ M Melittin ließen sich weder für Fluorescein noch für FITC-Dextran (4 kDa) signifikante Effekte auf die Permeabilität zeigen. Diese Ergebnisse überraschen insbesondere für die mittelkettige Fettsäure Laurat, deren Wirkung sich somit deutlich von der Wirkung des Caprats, einer verwandten Substanz, unterscheidet. Während beide Fettsäuren sich in ihrem Aufbau in nur 2 C-Atomen unterscheiden (bei Caprat handelt es sich um C10, bei Laurat um C12), konnte für Caprat im gleichen Zellmodell eine eindeutige Erhöhung der parazellulären Permeabilität von Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 10 kDa nachgewiesen werden (Krug et al., 2013) – Molekülen also in der Größenordnung des Insulins (Morishita et al., 1993).

Höhere Konzentrationen der eingesetzten Substanzen könnten zwar potentiell die epitheliale Permeabilität für größere Moleküle erhöhen, dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser Effekt durch eine den Zellverband beeinträchtigende Zellschädigung, nicht aber durch die Modifikation der parazellulären Barriere, verursacht würde. Im LDH-Freisetzungs-Assay waren höhere Konzentrationen beider Substanzen jeweils von einer deutlich erhöhten Enzymfreisetzung begleitet. Auch immunhistochemisch zeigte sich bei diesen Konzentrationen eine Veränderung der interzellulären Kontakte, die

Folge einer irreversiblen Zellschädigung sein könnten. Eine Permeabilisierung über geschädigte bzw. apoptotische Epithelareale hinweg wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht, da sie den Grundsätzen eines physiologischen Absorptionenhancements widerspräche. Die hierbei eingeschränkte Reversibilität der Wirkung könnte *in vivo* zudem das Risiko einer Translokation von Noxen über das geschädigte Darmepithel und für potentiell damit einhergehende immunologische Reaktionen erhöhen.

Für Melittin gilt somit in HT-29/B6-Epithelzellen, dass es trotz seines deutlichen Effekts auf den TER in nicht-toxischen Konzentrationen keine für ein Absorptionenhancement nutzbare permeabilisierende Wirkung zu haben scheint.

Im Falle von Laurat ist die beobachtete größenselektive Permeabilisierung für Fluorescein, nicht aber für FITC-Dextran (4 kDa) eventuell sogar von Vorteil: Während eine Permeabilisierung von Soluten der Größenordnung des Fluoresceins gewährleistet wird, bleibt das Epithel in seiner Barrierefunktion für größere Moleküle intakt. Eine Absorption von immunomodulatorischen bzw. -reaktiven Agenzien oder Noxen ist somit potentiell reduziert im Vergleich zu einer Permeabilisierung durch Caprat, das auch für deutlich größere Teilchen bis zu 10 kDa permeabilisiert (Krug et al., 2013).

Diese Wirkung des Laurats ließe sich insbesondere für niedermolekulare Medikamente nutzen, wie beispielsweise die Aminopenicilline Ampicillin (Molmasse 349,41 g·mol⁻¹) und Amoxicillin (Molmasse 365,4 g·mol⁻¹), die in einem ähnlichen Größenspektrum liegen wie das Fluorescein (330 Da). Insbesondere bei einem Absorptionenhancement von Antibiotika könnte das Erzielen einer verbesserten Absorption und somit einer möglichen Dosisreduktion potentielle Resistenzbildungen bei bakteriellen Erregern verhindern – was gerade im klinischen Alltag in Hinblick auf die Verbreitung und Entstehung multiresistenter Keime anzustreben ist.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass in verschiedenen Epithelzellmodellen nicht nur unterschiedliche Signalwege für die Regulation der Tight Junction verantwortlich sind – eine These, die auch in der Literatur vertreten wird (Lindmark et al., 1998) – sondern dass darüber hinaus die in einem Zellmodell beobachteten Effekte nicht immer direkt auf ein anderes Zellmodell übertragbar sind. Ursache hierfür kann mitunter die unterschiedliche endogene Proteinexpression und Signaltransduktion der verschiedenen Zelltypen sein, die für abweichende Reaktionen und Kompensationsmechanismen unter Substanzexposition verantwortlich ist.

Dies erfordert aber gerade bei der Interpretation der Ergebnisse für die *in vivo*-Anwendung von AEs ein besonderes Bewusstsein für zelltypspezifische Substanzwirkungen, da sich in unterschiedlichen Darmabschnitten Effekte somit potentiell sehr stark voneinander unterscheiden können.

In weiterführenden Experimenten könnten höhere Konzentrationen der beiden Substanzen auf eine parazellulär permeabilisierende Wirkung untersucht werden, sowie eine zusätzliche Verifizierung der Intaktheit des Epithels unter hohen Konzentrationen trotz vermehrter LDH-Freisetzung angestrebt werden. Des Weiteren müssten zur Eingrenzung der Signalwege in fortführenden Inhibitorexperimenten geeignete Blockersubstanzen ausgewählt werden, die bei Gabe keinen eigenen Effekt auf den TER haben.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte von Laurat und Melittin auf epitheliale Monolayer der Zelllinie HT-29/B6 untersucht und mit dem Fokus eines potentiellen Absorptionenhancements evaluiert.

In einem LDH-Freisetzungs-Assay wurde die Toxizität der eingesetzten Substanzen geprüft. Die Konzentrationen von 3,5 mM Laurat und 0,3 μ M Melittin hatten keine signifikante Enzymfreisetzung zur Folge, so dass diese Konzentrationen in allen folgenden Experimenten verwendet wurden.

In elektrophysiologischen Experimenten konnte der Effekt der Substanzen über eine zeit- und konzentrationsabhängige, reversible Abnahme des transepithelialen Widerstands gezeigt werden. Zwei-Wege-Impedanzspektroskopische Analysen bestätigten anschließend für Laurat und Melittin die Abnahme von R^{epi} über eine spezifische Abnahme des parazellulären Widerstands R^{para} . Der transzelluläre Widerstand R^{trans} war jeweils nicht verändert. Dieser isolierte Effekt auf den parazellulären Widerstand wurde als Modifikation der parazellulären Barriere und somit als Veränderung der Tight Junction gedeutet.

Mit der Veränderung des transepithelialen Widerstands unter Substanzexposition ging allerdings keine signifikante Veränderung der Permeabilität für größere Moleküle einher. Während sich für Melittin in Fluxexperimenten insgesamt keine signifikante Erhöhung der Permeabilität zeigte, konnte bei Laurat eine deutlich erhöhte parazelluläre Permeabilität für Fluorescein (330 Da) nachgewiesen werden, die sich jedoch nicht für Sulpho-NHS-SS-Biotin (606,7 Da) oder FITC-Dextran (4 kDa) zeigte.

Auch Western Blot-Analysen von Gesamtprotein und Membranfraktionen zeigten im Vergleich zu Kontrollen keinerlei Veränderungen in der Expression der Tight Junction-Proteine Occludin, Tricellulin und der Familie der Claudine. In immunhistochemischen Färbungen konnte allerdings durch Laurat eine reversible Abnahme von Claudin-5 in Tight Junctions nachgewiesen werden. Die Claudin-5-Expression blieb demnach insgesamt konstant, Claudin-5 wurde jedoch durch Laurateinwirkung innerhalb der Tight Junction reduziert.

Höhere Konzentrationen von 4,5 mM Laurat bzw. 1 μ M Melittin führten zu starken Veränderungen der interzellulären Kontaktstellen, welche auf eine generell gestörte Tight-Junction-Integrität deuteten. Eine sich auf diese Weise ausdrückende zelluläre Schädigung wurde nicht ausgeschlossen, da diese Ergebnisse im Einklang mit den Ergebnissen der Viabilitätstests standen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Melittin nicht in der Lage ist, in physiologischen Konzentrationen eine Absorptionsverstärkung pharmakologisch relevanter Moleküle durch eine Verbesserung der parazellulären Permeabilität in HT-29/B6-Zellen zu bewirken.

Laurat dagegen zeigt eine sehr spezifische und größenselektive Öffnung der Tight Junction und übertrifft nicht nur die relativ unspezifische Wirkung von Melittin, sondern auch die anderer Absorptionenhancer wie Caprat und Chitosan hinsichtlich einer selektiven Öffnung der Tight Junction für die Passage niedermolekularer Verbindungen bei gleichzeitiger Vermeidung des Durchtritts makromolekularer Noxen und immuno-reaktiver Substanzen.

Literaturverzeichnis

- Amasheh S, Wenzel U, Boll M, et al. (1997). Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 155(3):247-256.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, et al. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115(Pt 24):4969-4976.
- Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, et al. (2005). Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 321(1):89-96.
- Amasheh S, Dullat S, Fromm M, et al. (2009a). Inflamed pouch mucosa possesses altered tight junctions indicating recurrence of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 24(10):1149-1156.
- Amasheh S, Milatz S, Krug SM, et al. (2009b). Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 378:45-50.
- Amasheh M, Fromm M, Krug SM, et al. (2010). TNFalpha-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkappaB signalling. *J Cell Sci* 123:4145-4155.
- Amasheh M, Luetzig J, Amasheh S, et al. (2012). Effects of quercetin on the colonic cell culture model HT-29/B6 and rat intestine in vitro. *Ann NY Acad Sci* 1258:100-107.
- Anderson JM & Van Itallie CM (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 269(4 Pt 1):G467-475.
- Anderson JM & Cereijido M (2001). Introduction: Evolution of Ideas on Tight Junctions, In: Tight Junctions. Cereijido M & Anderson JM (Hrsg.), 2. Auflage, Kap. 1, S. 1-18. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Anderson JM & Van Itallie CM (2009). Physiology and function of the Tight Junction. *Cold Spring Harb Persp Biol* 2009 1(2):a002584.
- Aungst BJ, Saitoh H, Burcham DL, et al. (1996). Enhancement of the intestinal absorption of peptides and nonpeptides. *J Control Release* 41:19-31.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, et al. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134(4):1031-1049.
- Balda MS & Matter K (2009). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1788(4):761-767.
- Bizzozzero G (1870). Osservazioni sulla struttura degli epiteli pavimentosi stratificati. *Sci Rend 1st Lomb Accad Sci Lett* 3:675.
- Bjarnason I (1994). Intestinal Permeability. *Gut* 35(1 Suppl):S18-22.
- Blackwell B (1973). Drug therapy: patient compliance. *N Engl J Med* 289(5):249-252.
- Bonnet R (1895). Ueber die „Schlussleisten“ der Epithelien. *Deutsche medic Wochenschr* 21:58.
- Brosnahan AJ, Brown DR (2012). Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations. *Vet Microbiol* 156(3-4):229-237.
- Cereijido M, Stefani E, Palomo AM (1980). Occluding junctions in a cultured transporting epithelium: structural and functional heterogeneity. *J Membr Biol* 53(1):19-32.
- Cereijido M, Valdés J, Shoshani L, et al. (1998). Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 60:161-177.

- Chen YH, Merzdorf C, Paul DL, et al. (1997). COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* 138(4):891-899.
- Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, et al. (2002). Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 13(4):1227-1237.
- Chishti MS, Bhatti A, Tamim S, et al. (2008). Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. *J. Hum. Genet.* 53(2):101-105.
- Claude P & Goodenough DA (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58(2):390-400.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, et al. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(1):C142-C147.
- Del Vecchio G, Tscheik C, Tenz K, et al. (2012). Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Mol Pharm.* 9(9):2523-2533.
- Dörfel MJ, Huber O (2012). Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol.* 2012(2012): Article-ID 807356, 14 Seiten.
- Döring F, Walter J, Will J, et al. (1998a). Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J Clin Invest* 101(12):2761-2767.
- Döring F, Will J, Amasheh S, et al. (1998b). Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J Biol Chem* 273(36):23211-23218.
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, et al. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117(Pt 1):19-29.
- Francois CA, Connor SL, Wander RC, et al. (1998). Acute effects of dietary fatty acids on the fatty acids of human milk. *Am J Clin Nutr* 67(2):301-308.
- Fromm M (2010). Transport in Membranen und Epithelien, In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg.), 31. Auflage, Kap. 3, S. 36-48 und 895-897. Springer Medizin, Heidelberg.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123(6 Pt 2):1777-1788.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147(4):891-903.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, et al. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141(7):1539-1550.
- Furuse M, Furuse K, Sasaki H, et al. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153(2):263-272.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156(6):1099-1111.
- González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, et al. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81(1):1-44.
- González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778(3):729-756.

- Günzel D & Yu AS (2009a). Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle. *Pflügers Arch.* 458(1):77-88.
- Günzel D, Stuver M, Kausalya PJ, et al. (2009b). Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci* 122(Pt 10): 1507-1517.
- Günzel D, Krug SM, Rosenthal R, et al. (2010). Biophysical methods to study tight junction permeability, In: Current Topics in membranes. Yu ASL (Hrsg.), Vol. 65, Kapitel 3, S.39-78. Elsevier, Amsterdam.
- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, et al. (2002). Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277(1):455-461.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, et al. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141(1):199-208.
- Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129(2):550-64.
- Herdegen T & Böhm R (2010). Grundlagen der Pharmakotherapie, In: Pharmakologie und Toxikologie. Herdegen, T., 2. Auflage, Kap. 2, S. 6 – 32. Thieme, Stuttgart.
- Hering NA, Fromm M, Schulzke JD (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* 590(Pt 5):1035-1044.
- Hochman JH, Fix JA, LeCluyse EL (1994). In vitro and in vivo analysis of the mechanism of absorption enhancement by palmitoylcarnitine. *J Pharmacol Exp Ther* 269:813-822.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, et al. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171(6):939-945.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, et al. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147(6):1351-1363.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, et al. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154(3):491-497.
- Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, et al. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* 143(1):95-106.
- Jeansonne B, Lu Q, Goodenough DA, et al. (2003). Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cell Mol Biol.* 49(1):13-21.
- Jesaitis LA & Goodenough DA (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* disc-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* 124(6):949-961.
- Johansson A, Driessens M, Aspenström P (2000). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J Cell Sci* 113(Pt 18):3267-3275.
- Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, et al. (2006). Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest* 116(4):878-891.

- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, et al. (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13(4):875-886.
- Koefoed-Johnsen V & Ussing HH (1958). The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 42(3-4):298-308.
- Kojima S, Rahner C, Peng S, Rizzolo LJ (2002). Claudin 5 is transiently expressed during the development of the retinal pigment epithelium. *J Membr Biol*. 186(2):81-88.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, et al. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1778(3):631-645.
- Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, et al. (1991). Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 261(4 Pt 1):C574-582.
- Krug SM, Amasheh S, Richter JF, et al. (2009a). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 20(16):3713-3724.
- Krug SM, Fromm M, Günzel D (2009b). Two-path impedance spectroscopy for measurement of paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 97(8):2202-2211
- Krug SM, Amasheh M, Dittmann I, et al. (2013). Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials* 34(1):275-282.
- Kucukarslan SN (2012). A review of published studies of patients' illness perceptions and medication adherence: Lessons learned and future directions. *Res Social Adm Pharm* 8(5):371-382.
- Lindmark T, Nikkilä T, Artursson P (1995). Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 275(2):958-964.
- Lindmark T, Söderholm JD, Olaison, G, et al. (1997). Mechanism of Absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate. *Pharm. Res.* 14(7):930-935.
- Lindmark T, Kimura Y, Artursson P (1998). Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 284(1):362-369.
- Lüllmann-Rauch R (2009). Epithelgewebe: Oberflächenepithelien, In: Taschenatlas Histologie. Lüllmann-Rauch R, 3. Auflage, Kap. 7, S. 94-105. Thieme, Stuttgart.
- Maher S, Feighery L, Brayden DJ, et al. (2007). Melittin as an epithelial permeability enhancer I: investigation of its mechanism of action in Caco-2 monolayers. *Pharm Res* 24(7):1336-1345.
- Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, et al. (2009). TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res*. 336(1):67-77.
- Matter K & Balda MS (2007). Epithelial tight junctions, gene expression and nucleojunctional interplay. *J Cell Sci* 120(Pt 9):1505-1511.
- Mariano C, Sasaki H, Brites D, Brito MA. (2011). A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur. J Cell Biol* 90(10):787-796.
- Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M et al. (2010). Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 180(4):591-598.
- Martinez-Palomo A, Meza I, Beaty G, et al. (1980). Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 87:736-745.

- Martín-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, et al. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142(1):117-127.
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, et al. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109(Pt 9):2287-2298.
- Meier J (1995). Biology and distribution of hymenopterans of medical importance, their venom apparatus and venom composition, In: Clinical toxicology of animal venoms and poisons. Meier J & White J (Hrsg.), 1. Auflage, Kap. 21, S. 331-348. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, Carbonell-Estrany X, et al. (2011). Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clin Nutr* 30(1):116-23.
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, et al. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147(1):185-194.
- Mortimer C & Müller U (2010). Naturstoffe und Biochemie: Fette, Öle und Wachse, In: Chemie Basiswissen. Mortimer C & Müller U (Hrsg.), 10. Auflage, S. 611-612. Thieme, Stuttgart.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161(3):653-660.
- Nusrat A, Chen JA, Foley CS, et al. (2000). The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 275(38):29816-29822.
- Osterberg L & Blaschke T (2005). Adherence to Medication. *N Engl J Med* 353(5):487-497.
- Poliak S, Matlis S, Ullmer C, et al. (2002). Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J Cell Biol*. 159(2):361-372.
- Powell DW (1981). Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241(4):G275-G288.
- Pratt JP, Ravnic DJ, Huss HT, et al. (2005). Melittin-induced membrane permeability: a nonosmotic mechanism of cell death. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41(10):349-355.
- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*. 120(2):411-422.
- Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, et al. (2010). Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*. 21(7):1200-1213.
- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, et al. (2006). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 79(6):1040-1051.
- Rodriguez-Boulán E, Paskiet KT, Sabatini DD (1983). Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J Cell Biol* 96(3):866-874.
- Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, et al. (2002a). The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem* 277(30):27501-27509.
- Roh MH, Makarova O, Liu CJ, et al. (2002b). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157(1):161-172.

- Rosenthal R, Heydt MS, Amasheh M, et al. (2012a). Analysis of absorption enhancers in epithelial cell models. *Ann NY Acad Sci* 1258:86-92.
- Rosenthal R, Günzel D, Finger C, et al. (2012b). The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. *Biomaterials* 33(9):2791-2800.
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141(2):397-408.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11(12):4131-4142.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, et al. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137(6):1393-1401.
- Schipper NGM, Vårum KM, Artursson P (1996). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbed drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res* 13:1686-1692.
- Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, et al. (2005). Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim. Biophys Acta* 1669(1):34-42.
- Schneeberger EE & Lynch RD (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(6):C1213-1228.
- Shahiwala A (2011). Formulation approaches in enhancement of patient compliance to oral drug therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 8(11):1521-1529.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*. 285(5424):103-106.
- Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, et al. (1997). Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics*. 42(2):245-251.
- Staehelin L.A (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci* 13(3):763-786.
- Staehelin LA (1974). Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol* 39:191-283.
- Steed E, Rodrigues NT, Balda MS, et al. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol*. 10:95.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, et al. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103(3):755-766.
- Tepass U (2003). Claudin complexities at the apical junctional complex. *Nat Cell Biol* 5(7):595-597.
- Terwilliger TC & Eisenberg D (1982). The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J Biol Chem* 257(11):6016-6022.
- Tsukamoto T & Nigam SK (1999). Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins. *Am J Physiol* 276(5 Pt 2):F737 -750.
- Tsukita S & Furuse M. (1998). Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes Cells* 3(9):569-573.
- Tsukita S & Furuse M (2000a). The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann NY Acad Sci* 915:129-135.
- Tsukita S & Furuse M (2000b). Pores in the wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149:13-16.

- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4):285-293.
- Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, et al. (2008). Tight junction-based epithelial micro-environment and cell proliferation. *Oncogene* 27(55):6930-6938.
- Ussing HH & Windhager EE (1964). Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium. *Acta Physiol Scand* 61:484-504.
- Ussing HH & Zerahn K (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23:110-127.
- Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107(10):1319-1327.
- Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, et al. (2006). Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 291(6):F1288-1299.
- Van Itallie CM & Anderson JM (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68:403-429.
- Van Meer G, Gumbiner B, Simons K (1986). The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature* 322(6080):639- 641.
- Wade JB & Karnovsky MJ (1974a). The structure of the zonula occludens. A single fibril model based on freeze-fracture. *J Cell Biol* 60(1):168-180.
- Wade JB & Karnovsky MJ (1974b). Fracture faces of osmotically disrupted zonulae occludentes. *J Cell Biol* 62(2):344-350.
- Walker DC, MacKenzie A, Hosford S (1994). The structure of the tricellular region of endothelial tight junctions of pulmonary capillaries analyzed by freeze fracture. *Microvasc Res* 48(3):259-281.
- Walker DC, MacKenzie A, Hulbert WC, et al. (1985). A re-assessment of the tricellular region of epithelial cell tight junctions in trachea of guinea pig. *Acta Anat* 122(1): 35-38.
- Wang F, Daugherty B, Keise LL, et al. (2003). Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *J Respir Cell Mol Biol*. 29(1):62-70.
- Weber S, Hoffmann K, Jeck N, et al. (2000). Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet* 8(6):414-422.
- Windsor E & Cronheim GE (1961). Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids. *Nature* 190:263-264.
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 274(49):35179-35185.
- Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 340(24):1888-1899.
- Wong V (1997). Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1):C1859-1867.
- Wong V & Gumbiner BM (1997). A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 136(2):399-409.
- Yamazaki Y, Okawa K, Yano T, et al. (2008). Optimized proteomic analysis on gels of cell-cell adhering junctional membrane proteins. *Biochemistry* 47(19):5378-5386.
- Yeaman C, Grindstaff KK, Hansen MD, et al. (1999). Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place. *Curr Biol* 9(14):R515-517.

- Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ (2004). Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells. *J Cell Sci* 117(Pt 4):559-570.
- Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, et al. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 56(1): 61-72.

Internetquellen

GESTIS-Stoffdatenbank des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung zu den Stoffeigenschaften der Fettsäure Laurat:
[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/027100.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/027100.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0), aufgerufen 27.10.2012, 12:45 h.

US Food and Drug Administration zu einer Regulation von Laurat in Lebensmitteln:
<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/FoodAdditiveListings/ucm091048.htm#ftnL>, aufgerufen 24.10.2012, 10:00 h

Strukturformel der mittelkettigen Fettsäure Laurat von Sigma Aldrich:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/L9755?lang=de®ion=DE>, 19.11.2012, 11:00 h.

Abkürzungsverzeichnis

AE	Absorptionsenhancer
Ala	Alanin, Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin, Aminosäure
Asp	Asparaginsäure, Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>engl.</i> bicinchoninic acid)
BSA	Bovines Serumalbumin
bTJ	bizelluläre Tight Junction
^{14}C	Carbon-14, Radiocarbon, Isotop des Kohlenstoffs mit 6 Protonen und 8 Neutronen
Ca^{2+}	Calcium, Kation
CaCl	Calciumchlorid
Caco-2	epitheliale Zelllinie, einem kolorektalen Adenocarcinom entstammend
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
Cl^-	Chlorid, Anion
CLMP	CAR-Like Membrane Protein
$\text{CONH}_2 / \text{COOH}$	C-Terminus eines Peptids
COX	Cyclooxygenase, Enzym
CVC6/CVC8	externer Messverstärker
CTRL	Control, Kontrolle
c-Yes	Non-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, Enzym
D	Desmosom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dlg1	Drosophila disc large tumor suppressor
DFNB49	nicht-syndromale Taubheit
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGTA	Ethylen-Glycol-Tetraacetat
ESAM	endothelial cell-selective adhesion molecule
FDA	Food and Drug Administration
FHHNC	familiäres Hypomagnesiämie-Hypercalciurie-Nephrocalcinose-Syndrom
FKS	Fetales Kälberserum
FITC-Dextran	Fluoresceinisothiocyanat–Dextran
Gln	Glutamin, Aminosäure
Glu	Glutaminsäure, Aminosäure
Gly	Glycin, Aminosäure
HT-29/B6	epitheliale Zelllinie, Subklon aus dem Kolonkarzinom HT29
Ile	Isoleucin, Aminosäure
IPEC-J2	Intestinal Porcine columnar Epithelial Cells, epitheliale Zelllinie des porzinen Jejunums
I_{sc}	Kurzschlussstrom, eng. SC = short cut
JAM	Junctional Adhesion Molecule
JAM-A,-B,-C,-4	Junctional Adhesion Molecule A,B,C,4, TJ-
K^+	Kalium

LDH	Laktatdehydrogenase, Enzym
Leu	Leucin, Aminosäure
Lys	Lysin, Aminosäure
MAGUK	membrane associated guanylate kinase
MCFA	medium-chain fatty acid / mittelkettige Fettsäure
MDCK	Madin Darby Canine Kidney-Zellen
Mg ²⁺	Magnesium, Kation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ML7	1-(5-Iodonaphthalin-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepin-hydrochlorid, MLCK-Inhibitor
MLCK	Myosin-light-chain-kinase, Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MUPP1	Multi-PDZ-domain protein 1
MV	Mikrovilli
Na ⁺	Natrium, Kation
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NH ₂	N-Terminus eines Peptids
Pals1	Protein associated with Lin Seven 1
PAR	partitioning defective
PATJ	Pals1-associated tight junction protein
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline with tween
PDZ	PSD95-Dlg1-ZO-1
PepT1	Oligopeptidtransporter 1
PKC- ζ	Proteinkinase ζ , Enzym
PLA2	Phospholipase A2, Enzym
PLC	Phospholipase C, Enzym
PPN	μ -Nitrido-bis(triphenylphosphan)
Pro	Prolin, Aminosäure
PSD95	post synaptic density protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R _A	apikaler Widerstand
R _{BL}	basolateraler Widerstand
R _{LIS}	Widerstand des lateralen Interzellularspalts
R _{TJ}	Widerstand der Tight Junction
R ^{epi}	epithelialer Widerstand
R ^{trans}	transzellulärer Widerstand
R ^t	transepithelialer Widerstand, TER
R ^{para}	parazellulärer Widerstand
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Medium
SDS	Natriumdodecylsulphat
Ser	Serin, Aminosäure
SOC	Super Optimal Broth mit Glucose, Medium
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMP	TJ-assoziiertes Marvel-Protein
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TER	transepithelialer Widerstand, R ^t

Thr	Threonin, Aminosäure
TJ	Tight Junction
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Trp	Tryptophan, Aminosäure
Tric-a, -a1,-b, -c	Tricellulin-a,-a1,-b,-c, TJ-Proteine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTJ	trizelluläre Tight Junction
U	Formelzeichen der elektrischen Spannung
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UKBF	Universitätsklinikum Benjamin Franklin
Val	Valin, Aminosäure
VCSF	velo-cardio-faziales Syndrom
W-GLW-C-C	Tryptophan-Glycin-Leucin-Tryptophan-Cystein-Cystein, Aminosäuremotiv
W7	N-(6-Aminohexyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid, Ca^{2+} /Calmodulin-Antagonist
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZA	Zonula adherens
ZO	Zonula occludens
ZO-1,2,3	Zonula occludens-1,2,3, TJ-assozierte Proteine

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Verzeichnis der eigenen Publikationen

Originalarbeiten

Krug SM, Amasheh M, Dittmann I, Christoffel I, Fromm M, Amasheh S (2013). Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials* 34(1): 275–282.

Abstracts

Amasheh S, Krug SM, Dittmann I, Amasheh M, Fromm M (2012). Absorption enhancing mechanism of sodium caprate is mediated by regulated perturbation of tight junctions. Deutsche Physiologische Gesellschaft, 91st Annual Meeting; O92.

Dittmann I, Amasheh M, Krug SM, Fromm M, Amasheh S (2013). Laurate effects on paracellular permeability of HT-29/B6 intestinal monolayers. Deutsche Physiologische Gesellschaft, 92nd Annual Meeting; P165.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst PD Dr. Salah Amasheh und Prof. Dr. Michael Fromm, die mir ermöglicht haben, am Institut für Klinische Physiologie eine medizinische Doktorarbeit anzufertigen.

Dr. Salah Amasheh gilt mein besonderer Dank für die exzellente Betreuung und die ausgezeichnete, enge Zusammenarbeit, seinen steten Optimismus und die Fähigkeit, immer den Humor zu bewahren.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank Dr. Susanne Krug für die Durchführung und Auswertung der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie.

Bei Dr. Susanne Krug und Marcel Conrad möchte ich mich außerdem für die geduldige und oft spontane Hilfeleistung im Labor bedanken, die mir die erfolgreiche Bewältigung der Experimente sehr erleichtert hat.

Auch allen technischen Angestellten gilt mein Dank, besonders In-Fah Lee für die Bereitstellung und Pflege der Zellen, sowie Ing. grad. Detlef Sorgenfrei für die technische Unterstützung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern möchte ich mich für das angenehme Arbeitsumfeld, die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Isabel Dittmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Laurat und Melittin: Effekte im intestinalen Epithelzellmodell HT-29/B6* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift